



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
LABORATÓRIO DE BIOCATÁLISE

## **BIORREDUÇÃO DE BIS-CHALCONAS COM FERMENTO DE PÃO**

**JUANA GOULART STOLLMAIER**

Florianópolis  
Novembro/2015

**Juana Goulart Stollmaier**

## **BIORREDUÇÃO DE BIS-CHALCONAS COM FERMENTO DE PÃO**

Projeto de Estágio Supervisionado II (QMC 5512)  
efetuado no Laboratório de Biocatálise, sob orientação  
da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça Nascimento  
e apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis  
Novembro/2015  
**Juana Goulart Stollmaier**

## **BIORREDUÇÃO DE BIS-CHALCONAS COM FERMENTO DE PÃO**

---

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize  
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça Nascimento  
Orientadora

---

Prof. Dr. Ricardo Jose Nunes

---

Prof. Dr. Fábio Zazyki Galetto

Florianópolis  
Novembro/2015

## AGRADECIMENTOS

- A toda minha família pelo apoio e incentivo que sempre me deram, pois sem eles dificilmente eu estaria onde estou hoje.
- A minha orientadora, Profa. Graça, que aceitou meu pedido de ajuda quando eu estava chegando perto do momento crítico da minha graduação, e que sempre acreditou no potencial de todos os seus alunos, inclusive nos que acabam desenhando sem querer um carbono com cinco ligações químicas.
- Aos professores Ricardo J. Nunes, Patrícia D. Neuenfeldt e Alexandre Luis Parize pela ajuda e colaboração entre laboratórios para a elaboração desse TCC, dando dicas, ideias e também alguns reagentes.
- Ao pessoal do laboratório de Biocatálise: Jaque, Julyetty, César, Manu, Fernanda, Douglas, Leandro, Paulo, Pâmela, Miny que tornaram o laboratório não apenas um espaço de trabalho, mas também um espaço de muita alegria.
- Aos professores que me mostraram partes do que é a química e despertaram minha paixão por ela.
- A todos os meus amigos, dentro e fora do curso, que me apoiaram nas horas de estudar e nas horas de beber uma cerveja.
- A Iasmily “Miny” Brasil, que é minha melhor amiga desde o dia “-1” da graduação e parceira de laboratório que nenhum relatório mal feito pode separar.
- Ao meu namorado atrapalhado Octávio, que consegue me fazer sorrir quando as coisas parecem ficar muito difíceis.
- A Sumbal Saba e ao Jamal R. Khan (LabSEN) pelos espectros de RMN-<sup>1</sup>H.
- Ao Idejan P. Gross pelas microscopias das microesferas.
- A UFSC, ao Departamento de Química, Central de Análises e instituições de fomento (CAPES, CNPq e INCT-Catálise) por possibilitarem a realização deste e outros trabalhos.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	2
2.1. Reação de redução <i>via</i> química .....	2
2.2. Enzimas .....	3
2.2.1. Classificação das enzimas .....	6
2.2.2. Cofatores e células íntegras .....	7
2.3. Sistemas de imobilização .....	9
2.4. Chalconas e Bis-Chalconas .....	9
3. OBJETIVOS .....	12
3.1. Objetivos Gerais .....	12
3.1.1. Objetivos Específicos .....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1. Equipamentos .....	13
4.2. Reagentes e solventes .....	13
4.3. Procedimentos Experimentais .....	14
4.3.1. Síntese das bis-chalconas .....	14
4.3.2. Redução com $\text{NaBH}_4$ .....	15
4.3.2.1. Redução com $\text{SiO}_2$ em meio etanólico .....	15
4.3.2.2. Redução sem $\text{SiO}_2$ em meio metanólico .....	16
4.3.3. Biotransformação com <i>S. cerevisiae</i> .....	17
4.3.3.1. Reação em sistema bifásico .....	17
4.3.3.2. Reação em sistema monofásico com imobilização da BC em papel .....	18
4.3.3.3. Reações em sistema monofásico com imobilização do FP em microesferas .....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	19
5.1. Síntese das bis-chalconas e redução via $\text{NaBH}_4$ .....	19

5.2. Biotransformação com o fermento biológico de pão ( <i>S. cerevisiae</i> ).....	28
5.2.1. Primeiros testes.....	28
5.2.2. Testes de imobilização da BC em papel de filtro e do FP em alginato de cálcio.....	32
6. CONCLUSÕES .....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Hidrogenação sobre a superfície do catalisador de Pd/C.[4].....	2
<b>Figura 2.</b> Representação do complexo estrutural da urease da espécie de “feijão-de-porco” <i>Canavalia ensiformis</i> [11].....	4
<b>Figura 3.</b> Diagrama de energia para uma reação catalisada e uma não catalisada. [10] .....	4
<b>Figura 4.</b> Mecanismos propostos para a catálise enzimática. [13] .....	5
<b>Figura 5.</b> Biohidrogenação do 1,3-diaril-2-propen-1-ona.[20] .....	7
<b>Figura 6.</b> Biorredução assimétrica de alcenos ativados utilizando enoato-redutases dependentes da coenzima flavina. [18].....	8
<b>Figura 7.</b> Estrutura do alginato que contém as unidades dos ácidos manurônico e gulurônico.....	9
<b>Figura 8.</b> Estrutura básica de uma chalcona .....	10
<b>Figura 9.</b> Condensação de Claisen-Schmidt. [4] .....	10
<b>Figura 10.</b> Estrutura básica de uma bis-chalcona simétrica. [24] .....	11
<b>Figura 11.</b> Rota sintética para a preparação das bis-chalcona 5a através da condensação com 4 e 3a-b. KOH/EtOH/Agitação magnética. [24] .....	15
<b>Figura 12.</b> Rota sintética para a preparação das bis-chalconas 8a-d via condensação com 7 e 6a-d. KOH/EtOH/Agitação magnética. [24] .....	15
<b>Figura 13.</b> Reações de redução das BC's 5a ou 8a-c via NaBH <sub>4</sub> .....	16
<b>Figura 14.</b> Representação de um sistema bifásico. [13] [19] .....	17
<b>Figura 15.</b> Bis-chalcona 5a. ....	20
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN - <sup>1</sup> H da BC – 5a. (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). t = 6h .....	21

<b>Figura 17.</b> Espectro RMN - $^1\text{H}$ BC - 5a reduzida com $\text{NaBH}_4$ .(200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). t = 6h .....	22
<b>Figura 18.</b> Espectro de IV da bis-chalcona 8b (KBr). t = 6h.....	23
<b>Figura 19.</b> Espectro de IV da bis-chalcona 8b reduzida com $\text{NaBH}_4$ (KBr). t = 6h...	23
<b>Figura 20.</b> Bis-chalcona 5a e o composto reduzido <i>via</i> $\text{NaBH}_4$ .....	24
<b>Figura 21.</b> Bis-chalcona 8a incluir a estrutura do álcool tb .....	24
<b>Figura 22.</b> Espectro de RMN - $^1\text{H}$ da BC – 8a. (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). t = 6h.....	25
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN - $^1\text{H}$ da BC – 8a reduzida com $\text{NaBH}_4$ .(400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). t = 6h .....	26
<b>Figura 24.</b> Bis-chalcona 8b incluir a estrutura do álcool tb .....	26
<b>Figura 25.</b> Bis-chalcona 8c incluir a estrutura do álcool tb .....	27
<b>Figura 26.</b> Bis-chalcona 8d .....	27
<b>Figura 27.</b> Sistema trifásico resultante da tentativa de extração do produto entre n-hexano, DMSO e $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .....	29
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN - $^1\text{H}$ da BC – 8a biorreduzida com FP em meio de n-hexano com co-solventes variados. (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). t = 24h.....	31
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN - $^1\text{H}$ da BC 8a imobilizada em papel filtro e biorreduzida com FP, fase n-hexano. (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). t = 48h.....	33
<b>Figura 30.</b> Espectro de IV (KBr) da BC 8a imobilizada em papel filtro e biorreduzida com FP, fase de $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . t = 48h.....	34
<b>Figura 31.</b> Preparação das microesferas de alginato de cálcio com bomba peristáltica e a forma final da microesfera. ....	35
<b>Figura 32.</b> Microscopia da microesfera inteira (2,45 mm) e de corte (200 $\mu\text{m}$ ) com a parte interior da microesfera.....	35
<b>Figura 33.</b> Microscopia da microesfera espremida com liberação de água e de FP. (107,68 $\mu\text{m}$ ). ....	36
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN - $^1\text{H}$ da BC 8a biorreduzida com FP imobilizado em microesferas (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). t = 48h.....	37
<b>Figura 35.</b> Espectro de IV da BC 8a biorreduzida com FP imobilizada em microesferas e sem trealose (KBr). t = 48h .....	37
<b>Figura 36.</b> Espectro de IV da BC 8a biorreduzida com FP imobilizada em microesferas e com trealose (KBr). t = 48h .....	38
<b>Figura 37.</b> Espectro de IV da BC 5a (KBr). t = 6h.....	43
<b>Figura 38.</b> Espectro de IV da BC 8a (KBr). t = 6h.....	44

<b>Figura 39.</b> Espectro de IV da BC 8a reduzido com NaBH <sub>4</sub> (KBr). t = 6h .....	44
<b>Figura 40.</b> Espectro de RMN - <sup>1</sup> H da BC 8b. (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). t = 6h.....	45
<b>Figura 41.</b> Espectro de RMN - <sup>1</sup> H da BC 8b reduzida com NaBH <sub>4</sub> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). t = 6h .....	45
<b>Figura 42.</b> Espectro de RMN - <sup>1</sup> H da BC 8c. (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). t = 6h.....	46
<b>Figura 43.</b> Espectro de RMN - <sup>1</sup> H da BC 8c reduzida com NaBH <sub>4</sub> . (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). t = 6h .....	46
<b>Figura 44.</b> Espectro de IV da BC 8c (KBr). t = 6h .....	47
<b>Figura 45.</b> Espectro de IV da BC 8a reduzido com NaBH <sub>4</sub> (KBr). t = 6h .....	47
<b>Figura 46.</b> Espectro de RMN - <sup>1</sup> H da BC 8d. (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6). t = 6h .....	48
<b>Figura 47.</b> Espectro de IV da BC 8d (KBr). t = 6h.....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das enzimas pela UIBBM.[16].....	6
<b>Tabela 2.</b> Coenzimas requeridas em reações de biotransformação [18] .....	8
<b>Tabela 3.</b> Bandas de IV [26].....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

FP – Fermento biológico de pão

BC – Bis-chalcona

EtOH - Etanol

MeOH - Metanol

SB - Sistema bifásico

RMN-<sup>1</sup>H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (ou próton)

IV – Infravermelho

CCD – Cromatografia de Camada Delgada



## RESUMO

A utilização de catalisadores na síntese orgânica tem sido relacionada a problemas de toxicidade e alto custo, portanto novas alternativas catalíticas estão sendo exploradas, como por exemplo, a utilização de enzimas, conhecidas como biocatalisadores. A atividade catalítica das enzimas pode ser regulada com variações de temperatura, concentração dos substratos e pH, podendo ser enantio e quimiosseletivas. Neste trabalho, as enzimas utilizadas estão presentes na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, encontrada no fermento biológico de pão (**FP**). Estas são capazes de reduzir ligações duplas em compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados como, por exemplo, as chalconas de forma quimiosseletiva. As bis-chalconas são compostos simétricos que possuem atividade biológica, atuando na inibição de receptores cancerígenos e ação anti-tuberculose. Nesse trabalho, foi realizada a síntese de 5 bis-chalconas com ligantes variados (-H, -2,5-OCH<sub>3</sub>, -2-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -3,4-OCH<sub>2</sub>O) utilizando duas rotas de condensação de Claisen-Schmidt, sendo a primeira reação feita com 2mmol de benzaldeídos substituídos e 1 mmol de 1,4-diacetilbenzeno, com adição de 10 gotas de KOH sob agitação em 20 mL de EtOH em um erlenmeyer. A segunda reação foi feita com 2mmol de acetofenonas substituídas e 1 mmol de tereftaldeído, sendo as condições reacionais as mesmas do primeiro método. Nas reações de redução com **FP**, e para evitar formação de emulsão típica entre a fase aquosa do **FP** com a fase orgânica do substrato em um sistema bifásico, o biocatalisador foi imobilizado em microesferas de alginato de cálcio. Para a biorredução da **BC** utilizando **FP**, utilizou-se cerca de 170 mg do substrato (0,5 mmol) e 4 g de **FP** comercial (Fleischmann) imobilizado em sistema monofásico contendo *n*-hexano (16 mL), DMSO (4 mL). O sistema ficou sob agitação por 48h a 35 °C. Os substratos e os produtos da biorredução foram caracterizados por RMN-<sup>1</sup>H e IV e os resultados serão apresentados nesse trabalho.

Palavras-chave: bis-chalconas, biorredução, fermento de pão

## 1. INTRODUÇÃO

A síntese orgânica tem sido ao longo dos anos uma das áreas científicas mais bem-sucedidas e com enorme utilidade prática, pois com novas estratégias torna-se possível a preparação de produtos naturais, fármacos, polímeros, agrotóxicos, conservantes alimentícios e moléculas funcionais cada vez mais requeridas pelo cotidiano das sociedades modernas. Porém, este desenvolvimento teve suas consequências negativas, como a produção de diversos subprodutos tóxicos e a utilização de solventes orgânicos nocivos ao meio ambiente, sendo estes efeitos ignorados até a denúncia contra o agrotóxico DDT (diclorodifeniltricloroetano), feita no livro “Primavera Silenciosa” da escritora Rachel Carson em 1962.<sup>[1]</sup> Em 1991, a Agência de Proteção ao Meio-Ambiente dos Estados Unidos decretou um ato de prevenção a poluição, e assim Paul Anastas e John Warner definiram o termo “química verde” como a obtenção de produtos químicos e processos que reduzem ou eliminam o uso e geração de resíduos tóxicos e perigosos.<sup>[2]</sup> Dentro desse tópico há uma constante procura por rotas sintéticas que ofereçam bons rendimentos e usos de menor quantidade (ou nenhuma) de solventes que sejam considerados “não verdes”. Um aspecto importante em síntese é a utilização de catalisadores, e ao utilizar catalisadores biológicos pode-se aproximar mais dos objetivos propostos pela química verde.

Os catalisadores biológicos são, em geral, enzimas que são classificadas como proteínas capazes de acelerar a velocidade de reações, em sua maioria biológicas. Com o uso de enzimas em sínteses, dois dos maiores problemas da área podem ser contornados, como a produção de complexos bioquímicos solúveis em água e o desenvolvimento de processos sintéticos não nocivos ao meio ambiente.

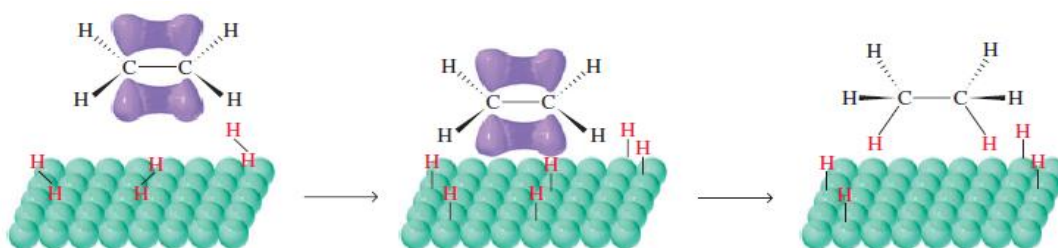
O uso de enzimas apresenta diversas vantagens, e algumas delas são as altas seletividades pelos substratos e estereosseletividade nas reações. A atividade catalítica pode ser regulada com variações de temperatura, concentração de substratos e pH, e podem ser quirais e enantiosseletivas. No entanto, dependendo do tipo de enzima, o custo pode ainda ser bastante alto e algumas delas apresentam certa instabilidade.<sup>[3]</sup> As enzimas estão presentes no nosso cotidiano de diversos modos, inclusive nos fermentos biológicos.

Os fermentos, por sua vez, são bastante conhecidos pela sua ampla utilização na produção de pães, cervejas, vinhos e em escala industrial para a produção de bioetanol. Os processos realizados pelos fermentos acontecem devido às enzimas presentes nos microorganismos. Por exemplo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, é capaz de transformar carboidratos em dióxido de carbono e álcool. Portanto, a partir estas considerações, nesse trabalho foram preparadas e caracterizadas bis-chalconas que são compostos passíveis de reagir *via* biorredução com fermento biológico de pão (levedura *S. cerevisiae*), em diferentes condições reacionais.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Reação de redução *via* química

A adição de  $H_2$  em alcenos é conhecida como hidrogenação ou reação de redução. Uma reação de redução aumenta o número de ligações C-H e diminui as ligações C-O, C-N ou C-X ( $X$  = halogênio).<sup>[4]</sup> Porém, esta reação não ocorre facilmente e necessita da presença de um catalisador metálico, sendo o mais utilizado o paládio sobre carbono (Pd/C), que consegue enfraquecer a ligação H-H, formando ligações metal-hidrogênio na superfície do catalisador (**Figura 1.**). O alceno também é adsorvido na superfície do catalisador e ocorre a transferência de um átomo de hidrogênio para o alceno, formando uma nova ligação C-H e assim ocorre com o segundo hidrogênio, gerando um produto saturado. Paul Sabatier ganhou o prêmio Nobel em 1912 junto com Victor Grignard pelo desenvolvimento do método de hidrogenação de compostos orgânicos na presença de metais finamente particulados e pelo grande progresso na química orgânica ao longo dos anos.<sup>[5]</sup>



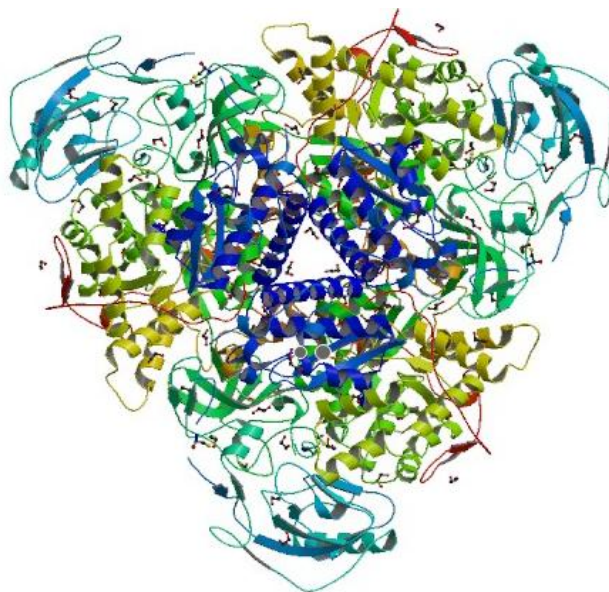
**Figura 1.** Hidrogenação sobre a superfície do catalisador de Pd/C.<sup>[4]</sup>

As reações de hidrogenação são amplamente utilizadas na indústria petroquímica e na de alimentos. A clivagem de hidrocarbonetos complexos encontrados no petróleo ocorre via hidrogenação destrutiva, gerando cadeias menores e com maior poder calorífico, como por exemplo, a gasolina.<sup>[6]</sup> Em 1901, o químico alemão Wilhelm Normann desenvolveu a hidrogenação em gorduras (ácidos graxos) sob patente alemã. Esta pesquisa levou a obtenção das gorduras trans, que possuem grande influência na margarina e na diminuição de cadeias alquílicas presentes em espécies vegetais.<sup>[7]</sup> Atualmente, os riscos envolvidos com a gordura trans já são bem conhecidos, principalmente na saúde, pois a gordura trans é capaz de aumentar os níveis do colesterol “ruim” (LDL) e também abaixar o colesterol “bom” (HDL), e com isso há um aumento na incidência de acidentes cardiovasculares.<sup>[4]</sup>

As maiores dificuldades envolvidas na hidrogenação catalítica é o alto custo dos diversos suportes necessários (Pd/C, Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Pd/CaCO<sub>3</sub>, Pd/BaSO<sub>4</sub>)<sup>[8]</sup>, risco de explosão em etapas de pré-ativação (pirofórico)<sup>[9]</sup> e necessidade de reatores para trabalhar com altas temperaturas e pressões. Portanto, há uma constante busca por novos catalisadores para reações de redução, como por exemplo, a utilização de enzimas, que são considerados como biocatalisadores e dependendo da classificação, estas são capazes de reduzir compostos insaturados (ativados com grupos retiradores de elétrons ou não) de forma eficiente.

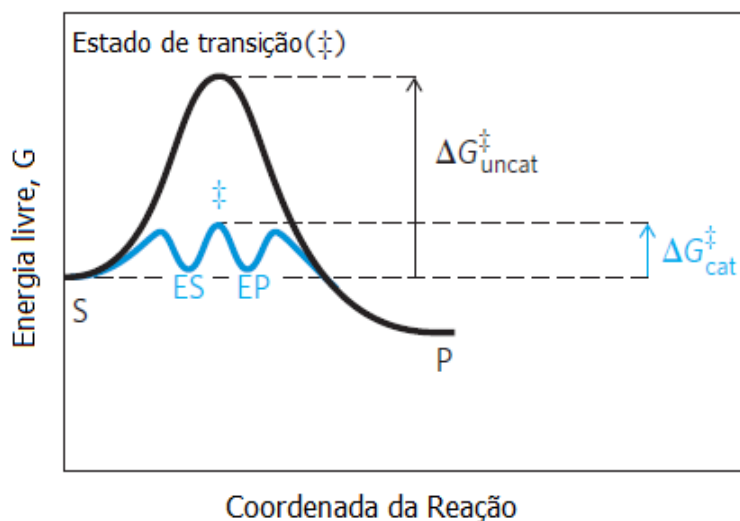
## 2.2. Enzimas

A catálise biológica foi descoberta em torno de 1700, após observações da digestão de carne pelas secreções retiradas do estômago. Em 1850, Louis Pasteur concluiu que as leveduras, chamadas de fermentos, eram as responsáveis pela fermentação de açúcar em álcool. O nome “enzima” vem do grego *enzymos*, que significa levedado, fermentado. Apenas em 1926 a urease (**Figura 2.**) foi isolada e cristalizada por James Sumner, que indentificou-a como uma proteína, sendo este feito um grande avanço para os estudos enzimáticos. Sumner, Northrop e Stanley ganharam o prêmio Nobel em 1946 pelo desenvolvimento das técnicas de cristalização e purificação de enzimas.<sup>[10]</sup>



**Figura 2.** Representação do complexo estrutural da urease da espécie de “feijão-de-porco” *Canavalia ensiformis*.<sup>[11]</sup>

As enzimas são substâncias de origem biológica capazes de acelerar reações químicas <sup>[10],[12]</sup> pela geração de um novo caminho reacional de menor energia de ativação, diminuindo a energia de ativação total da reação (**Figura 3**).<sup>[4]</sup>

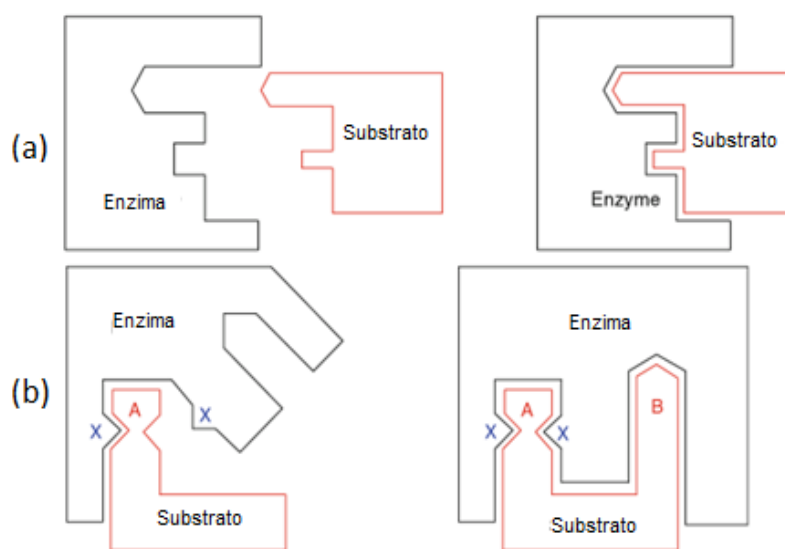


**Figura 3.** Diagrama de energia para uma reação catalisada e uma não catalisada. <sup>[10]</sup>

As enzimas em sua maioria são proteínas globulares que possuem um espaço em sua superfície que é denominada sítio ativo. O sítio ativo é uma pequena cavidade da enzima composta por determinados resíduos de aminoácidos cujas

cadeias laterais formam uma superfície tridimensional (similar a um bolso) que pode ser complementar ao substrato e que são essenciais para a atividade catalítica.<sup>[10]</sup> O substrato liga-se às enzimas através do sítio ativo para a formação do complexo enzima-substrato (também chamado de “complexo Michaelis-Menten”). O reconhecimento molecular de um substrato ocorre no sítio ativo devido as terminações de aminoácidos que são encontrados na superfície, ocorrendo por interações eletrostáticas, van der Waals e por ligações de hidrogênio.<sup>[4]</sup> As enzimas são protagonistas em processos bioquímicos atuando de forma organizada, sendo capazes de transformar precursores simples em macromoléculas biológicas e catalisar centenas de etapas em reações biológicas com geração de energia para o organismo.<sup>[10]</sup>

Na catálise enzimática há dois modelos de mecanismos que são considerados os mais ilustrativos para os químicos orgânicos, sendo eles o “chave-fechadura” (**Figura 4-a**) e o do “ajuste induzido” (**Figura 4-b**).<sup>[13]</sup> O mecanismo da “chave-fechadura” foi proposto por Emil Fischer em 1894, que assumiu que a interação entre a enzima e o substrato funcionava como uma chave e uma fechadura, considerando que a estrutura da enzima fosse completamente rígida. Porém, essa teoria não consegue explicar o fato de que diversas enzimas são capazes de catalisar diferentes substratos e não apenas os substratos naturais.<sup>[13]</sup> Por exemplo, a lipase tem como função principal fazer a digestão, o transporte e processamento de lipídeos na dieta animal, mas também pode ser aplicada na produção de biodiesel em indústrias.<sup>[14]</sup>



**Figura 4.** Mecanismos propostos para a catálise enzimática.<sup>[13]</sup>

Daniel E. Koshland Jr., bioquímico americano, foi o primeiro a sugerir o mecanismo de “ajuste induzido” baseado em seu trabalho com cinética enzimática. Esse ajuste pode ser comparado a uma mão se ajustando a uma luva,<sup>[15]</sup> pois o mesmo assume que a enzima pode mudar sua conformação dependendo da influência que a estrutura do substrato pode exercer sobre a enzima. Com esse modelo, é possível explicar o motivo de diversas estruturas presentes no substrato serem importantes além dos grupos mais reativos na biotransformação.

As enzimas podem aumentar a velocidade de uma reação em cerca de 5 até 17 ordens de magnitude através da energia livre, chamada “energia de ligação  $\Delta G_b$ ”, que é liberada por interações fracas no complexo enzima-substrato que são capazes de estabilizar o restante das ligações. Assim, as energias de ativação de reações catalisadas por enzimas são menores que as não catalisadas.<sup>[10]</sup>

### 2.2.1. Classificação das enzimas

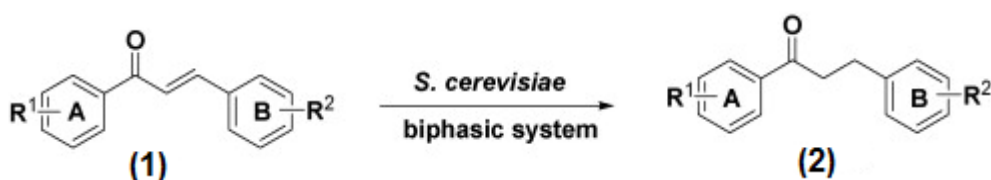
Segundo o *Enzyme Database*, organizado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM), há cerca de 6605 enzimas classificadas, todas elas subdivididas em 6 classes de acordo com o tipo de reação que elas são capazes de catalisar.<sup>[10],[16]</sup> (**Tabela 1**)

**Tabela 1.** Classificação das enzimas pela UIBBM.<sup>[16]</sup>

Classe	% catalogada	Reações
Oxirredutases	29	Oxi-redução
Transferases	27,6	Transferência de grupos funcionais
Hidrolases	25,5	Hidrólise de diversas ligações
Liasas (Sintase, Dehidratase)	10,5	Clivagem de C-C, C-O, C-N e outras ligações por hidrólise ou oxidação
Isomerases	4,2	Rearranjo intramolecular
Ligases (Sintetases, Carboxilases)	3	Formação de ligações com hidrólise de ATP

Na classe das oxirredutases, há uma subdivisão com três categorias; redutases, oxigenases e oxidases.<sup>[13],[16]</sup> Alguns microorganismos como *Sacharomyces cerevisiae* (fermento de pão, FP) são capazes de produzir pão, vinhos, cervejas, bioetanol,<sup>[17]</sup> fármacos e outros produtos industriais devido a presença de oxirredutases no interior celular.

Utilizando esse conhecimento, pode-se utilizar *S. cerevisiae* como um biocatalisador para compostos  $\alpha,\beta$ -insaturados com duplas ligações ativadas (**Figura 6.**), como as chalconas, pela presença das enzimas enoato redutases e desidrogenases nesse microorganismo.<sup>[18],[19]</sup> Um exemplo na literatura é o trabalho desenvolvido por Silva, Stambuk e Nascimento (2010), onde foi estudada a biohidrogenação do 1,3-diaril-2-propen-1-ona (**1**) para (**2**) de forma quimiosseletiva utilizando a *S. cerevisiae* em sistema bifásico. (**Figura 5.**)<sup>[20]</sup>



**Figura 5.** Biohidrogenação do 1,3-diaril-2-propen-1-ona.<sup>[20]</sup>

Neste trabalho os autores utilizaram células íntegras, as quais dispensam o uso de enzimas dependentes do uso de cofatores com alto custo de compra para a regeneração da atividade catalítica.

### 2.2.2. Cofatores e células íntegras

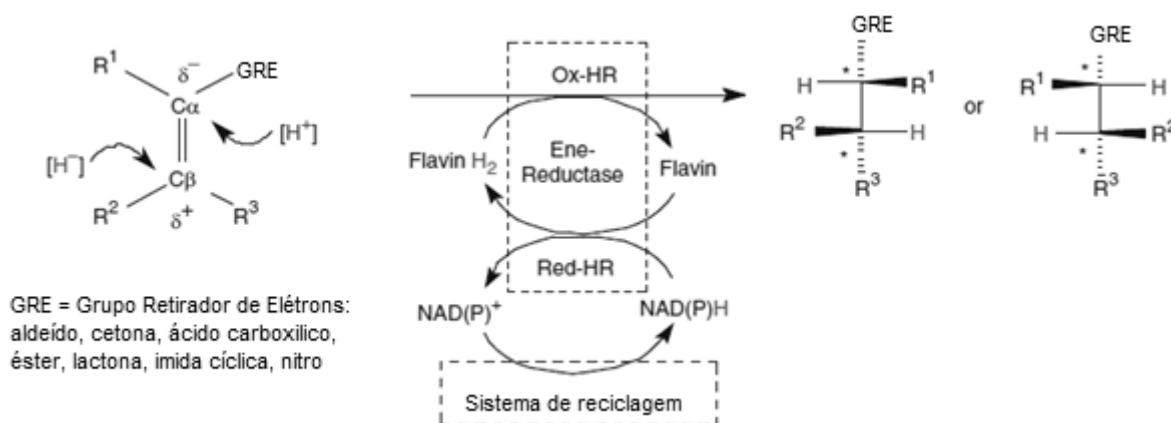
Cofatores são compostos não-proteinogênicos necessários para as enzimas, podendo formar ligações covalentes ou não-covalentes. No caso de interações não-covalentes, o cofator é também conhecido como coenzima a qual é modificada durante o processo catalítico e, portanto, sua regeneração nas reações seguintes é fundamental para manter um ciclo catalítico com alta atividade. Em um processo de redução catalisado por oxi-redutases, o NAD(P)H atua como agente redutor e é necessário que seja adicionado em concentrações estequiométricas no meio reacional caso o pesquisador opte por utilizar apenas a enzima.<sup>[18]</sup> No caso de



células íntegras (*whole cell*), o cofator (ou coenzima), já se encontra presente junto com a enzima, evitando a necessidade de etapas de regeneração do cofator a cada ciclo catalítico pois o próprio metabolismo do organismo promove a regeneração.<sup>[19]</sup> Na **Tabela 2** são apresentadas as coenzimas mais comuns utilizadas em reações de biotransformação.<sup>[18]</sup>

**Tabela 2.** Coenzimas requeridas em reações de biotransformação <sup>[18]</sup>

Coenzima	Tipo de reação
<b>NAD<sup>+</sup>/NADH &amp; NADP<sup>+</sup>/NADPH</b>	Redução de carbonila & álcool
<b>ATP</b>	Fosforilação
<b>SAM</b>	Alquilação de carbonos primários
<b>Acetyl-CoA</b>	Alquilação de carbonos secundários
<b>Flavinas</b>	Redução C=C, Oxidação de S e Ox. Bayer-Villiger
<b>Piridoxal-fosfato</b>	Transaminação, racemização
<b>Biotina</b>	Carboxilação
<b>Difosfato de tiamina</b>	Ligação C-C
<b>Porfirinas (-Metais)</b>	Peroxidação, oxigenação



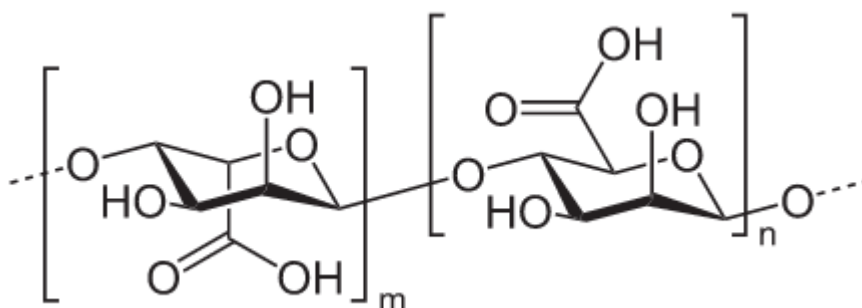
**Figura 6.** Biorredução assimétrica de alcenos ativados utilizando enoato-redutases dependentes da coenzima flavina. <sup>[18]</sup>

A *S. cerevisiae* é utilizada como célula íntegra, tanto na sua forma livre quanto utilizando estratégias de imobilização.

### 2.3. Sistemas de imobilização

Ao usar as enzimas, às vezes são necessárias estratégias de imobilização para que seja aproveitado o máximo da capacidade catalítica de uma enzima, em especial enzimas que possuem alto custo de aquisição. A utilização de polímeros naturais é bastante atraente para imobilização de enzimas, pois possuem grande abundância e biocompatibilidade.<sup>[21],[22],[23]</sup>

Para o desenvolvimento deste projeto, o alginato de cálcio foi escolhido como agente de imobilização devido a seu baixo custo, alta afinidade com água e capacidade de formar géis estáveis sob condições amenas.<sup>[22]</sup> É também atóxico e não-patogênico. O alginato é um polissacarídeo obtido de algas marinhas e composto dos derivados dos açúcares D-manuronato e o L-guluronato, sendo estas as unidades dos ácidos manurônico e gulurônico (**Figura 7.**), e a variação na razão entre eles altera as propriedades mecânicas e de gel. Este polímero natural é capaz de se mudar facilmente para a forma de gel quando seu cátion monovalente ( $\text{Na}^+$ ) é trocado em solução por um cátion divalente ( $\text{Ca}^{2+}$ ).<sup>[21]</sup>



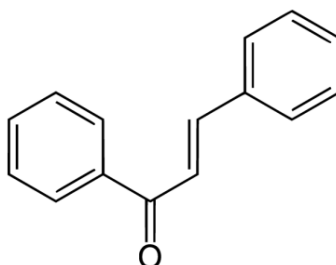
**Figura 7.** Estrutura do alginato que contém as unidades dos ácidos manurônico e gulurônico.

### 2.4. Chalconas e Bis-Chalconas

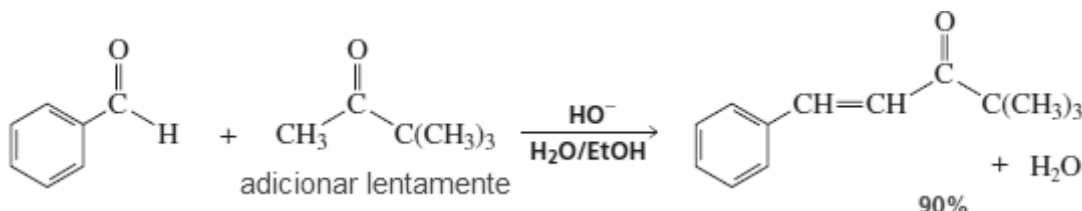
Na área de pesquisa da química medicinal, há uma grande preocupação com substâncias que possuem atividade anti-câncer, e os flavonoides são os candidatos

principais da quimioterapia com produtos naturais. Os estudos sugerem que uma dieta rica em flavonoides pode reduzir o risco de câncer de mama, pulmão e próstata.<sup>[23]</sup> Dentro da família das flavonas cita-se a classe das chalconas (**Figura 8**), que são facilmente sintetizadas pela condensação de Claisen-Schmidt entre um benzaldeído e uma acetofenona em solução de KOH (ou NaOH) como catalisador. (**Figura 9**).

Estes compostos apresentam uma grande variedade de atividades biológicas promissoras, tais como anti-diabética, anti-hipertensiva, anti-retroviral, anti-inflamatória, anti-histaminica, anti-malarial, etc.<sup>[24]</sup>

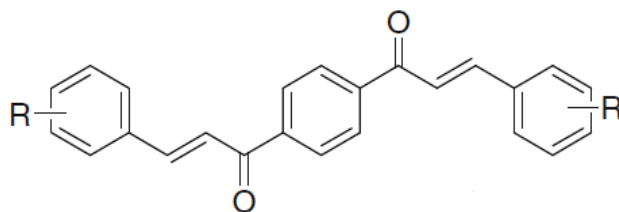


**Figura 8.** Estrutura básica de uma chalcona



**Figura 9.** Condensação de Claisen-Schmidt.<sup>[4]</sup>

Baseando-se no conhecimento e nas pesquisas desenvolvidas pelo grupo do Laboratório de Estrutura e Atividade (LEA), bis-chalconas simétricas (**Figura 10**) foram sintetizadas pela condensação de Claisen-Schmidt utilizando a proporção 2:1 benzaldeído e 1,4-diacetilbenzeno e as atividades biológicas foram avaliadas posteriormente. Algumas chalconas apresentaram resultados positivos com relação a atividade biológica, mais especificamente na inibição de receptores cancerígenos e ação anti-tuberculose.<sup>[24],[25]</sup>



**Figura 10.** Estrutura básica de uma bis-chalcona simétrica. <sup>[24]</sup>

As bis-chalconas são compostos que apresentam grupos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, portanto são passíveis de reagir por redução utilizando leveduras *S. cerevisiae*, e podem ser reduzidos a alcoóis ou hidrocarbonetos, gerando novos compostos com atividades biológicas não determinadas anteriormente.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo unir a química sintética medicinal das bis-chalconas simétricas sintetizadas pelo LEA do Departamento de Química - UFSC e o uso de levedura *S. cerevisiae* como biocatalisadores para reduzir quimiosseletivamente as bis-chalconas.

##### 3.1.1. Objetivos Específicos

- Otimização das sínteses de algumas bis-chalconas simétricas selecionadas baseadas em trabalhos desenvolvidos pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia D. Neuenfeldt e Prof. Dr. Ricardo José Nunes;
- Purificação e caracterização das bis-chalconas pelas técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) e espectrofotometria de infravermelho (IV); e determinação da pureza por cromatografia de camada delgada (CCD);
- Obtenção dos álcoois, que serão usados como padrões através da redução das carbonilas com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) e caracterização por RMN de  $^1\text{H}$ , IV e pureza por CCD;
- Utilização da levedura *S. cerevisiae* como catalisador para a reação de redução das bis-chalconas e avaliação das melhores condições reacionais da biotransformação (tempo, temperatura, componentes do sistema bifásico, agitação);
- Testes de imobilização do fermento de pão em suportes;
- Comparação dos resultados obtidos com outros citados na literatura;
- Organização e apresentação dos resultados finais obtidos no Estágio Supervisionado II.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biocatálise, orientado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça Nascimento, nos laboratórios 301 e 306 do Departamento de Química da UFSC.

As análises de RMN-<sup>1</sup>H e IV foram realizadas na Central de Análises, localizada no Departamento de Química da UFSC.

### 4.1. Equipamentos

- Agitadores magnéticos: Dist e/ou Micro Química
- Rotavapor: R II Buchi
- Balanças analíticas: Adventurer Ohaus-AR2140 e AND-EK200i
- Aparelho de ponto de fusão: Micro Química - APF301
- Espectrofotômetro de infravermelho: Bruker ALPHA FT-IR spectrometer
- Espectrômetro de RMN-<sup>1</sup>H: Varian AC 400F, 400MHz
- Bomba peristáltica: Razel R-100EC
- Microscópio: Motic MLC-150C

### 4.2. Reagentes e solventes

- Álcool etílico absoluto: Synth
- Clorofórmio P.A.: Synth
- Diclorometano P.A.: Vetec
- Hidróxido de potássio P.A: Biotec
- Borohidreto de sódio 98%: Aldrich
- Tereftaldeído 99%: Aldrich
- 1,4-Diacetilbenzeno 99%: Aldrich

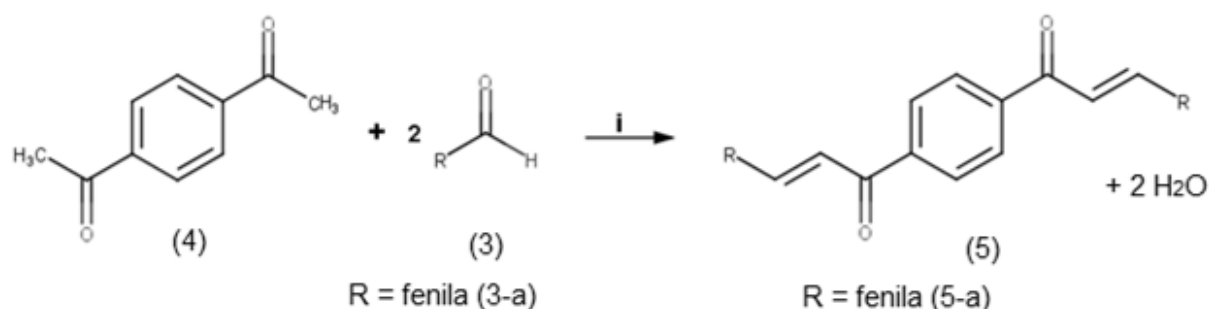
- Metanol: Cromoline
- Alginato de sódio: Sigma Aldrich
- Cloreto de cálcio anidro: Vetec
- Fermento biológico de pão: marca comercial Fleischmann
- Sílica gel 60G: Vetec
- DMSO: Grupo química
- Trealose: Sigma Aldrich
- n-hexano: Synth
- $\text{CDCl}_3$  99,8 com fita de prata: Cambridge Isotopes Laboratories
- $\text{DMSO}-d_6$ : Sigma Aldrich
- Éter etílico P.A.: Vetec
- Acetato de etila: Reagen
- Ácido cítrico anidro: CRQ
- Fosfato de potássio: Merck

### 4.3. Procedimentos Experimentais

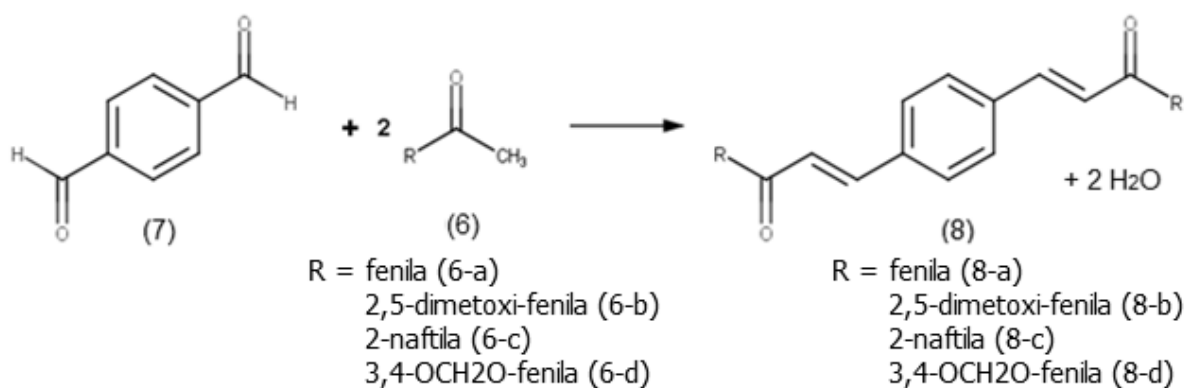
#### 4.3.1. Síntese das bis-chalconas

A síntese das bis-chalconas foi feita por duas rotas de condensação de Claisen-Schmidt, sendo a primeira reação feita com 2 mmol de benzaldeído (**3a**) e 1 mmol de 1,4-diacetilbenzeno (**4**), com adição de 10 gotas de KOH (10% m/v) sob agitação em meio alcoólico de 20 mL de EtOH <sup>[24]</sup> em um erlenmeyer (**Figura 11**). A segunda reação (**Figura 12**) foi feita com 2 mmol de acetofenonas (**6a-d**) substituídas e 1 mmol de tereftaldeído (**7**), sendo as condições reacionais as mesmas do primeiro método. Em alguns minutos, ocorreu a precipitação do produto colorido (amarelo) (**5a**) (**8a-d**), sendo que o meio reacional foi deixado sob agitação na capela por cerca de 5 h para a formação total do produto e obtenção de maior rendimento. Este tempo de reação foi utilizado em ambas as rotas. A reação então foi monitorada por análises periódicas de CCD (eluente n-hexano/acetato de etila 7:3). Após este período, o precipitado foi filtrado a vácuo em funil de Büchner e com

o produto seco foi determinado o ponto de fusão e comparado com os dados obtidos pela Dra. Patrícia D. Neuenfeldt.<sup>[24]</sup>



**Figura 11.** Rota sintética para a preparação das bis-chalcona 5a através da condensação com 4 e 3a-b. i = KOH/EtOH/Agitação magnética.<sup>[24]</sup>



**Figura 12.** Rota sintética para a preparação das bis-chalconas 8a-d via condensação com 7 e 6a-d. KOH/EtOH/Agitação magnética.<sup>[24]</sup>

#### 4.3.2. Redução com NaBH<sub>4</sub>

##### 4.3.2.1. Redução com SiO<sub>2</sub> em meio etanólico

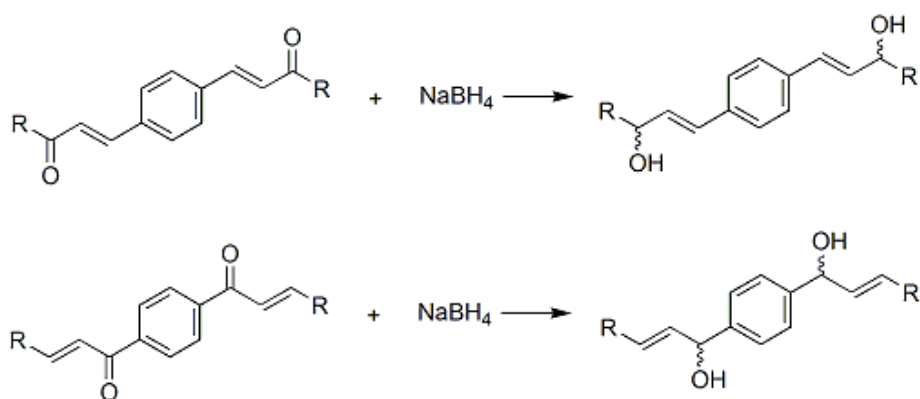
Em um erlenmeyer foi adicionado 1 mmol da bis-chalcona (**5a**) ou (**8a-c**) em 20 mL de EtOH absoluto e algumas gotas de clorofórmio para auxiliar na solubilização dos compostos no meio reacional. Lentamente, foi adicionado cerca de 4 mmol de NaBH<sub>4</sub> e 0,5 g de SiO<sub>2</sub> (5-40 μ). A reação foi deixada sob agitação a temperatura ambiente na capela por cerca de 6h, e monitorada por CCD (eluente n-hexano/acetato de etila 7:3). Após a formação do produto, este foi filtrado (filtração simples) para separar o sólido branco. A seguir, o sólido foi solubilizado em



diclorometano ou éter etílico (dependendo da BC) para remover a sílica e os boranos que são insolúveis em solventes orgânicos. A fase orgânica foi filtrada e rota-evaporada, e as diferentes BC reduzidas foram purificadas e analisadas posteriormente por IV e RMN-<sup>1</sup>H.

#### 4.3.2.2. Redução sem SiO<sub>2</sub> em meio metanólico

Em um erlenmeyer foi adicionado 0,5 mmol da bis-chalcona (**5a**) ou (**8a-c**) em 20 mL de MetOH absoluto e aproximadamente 5 mL de clorofórmio para auxiliar na solubilização dos compostos no meio reacional. Lentamente, foram adicionados 2 mmols de NaBH<sub>4</sub>, e a reação foi deixada sob aquecimento inicial (10 min) e agitação na capela por cerca de 6h e monitorada por CCD (eluente n-hexano/acetato de etila 7:3). Após a formação do produto, este foi filtrado (filtração simples) para separar o sólido branco. A seguir, o sólido foi solubilizado em diclorometano ou éter etílico (dependendo da BC) para retirar os boranos que são insolúveis em solventes orgânicos. A fase orgânica foi filtrada e rota-evaporada, e as diferentes BC's reduzidas foram purificadas e posteriormente analisadas por IV e RMN-<sup>1</sup>H. (**Figura 13**)



**Figura 13.** Reações de redução das BC's 5a ou 8a-c via NaBH<sub>4</sub>.

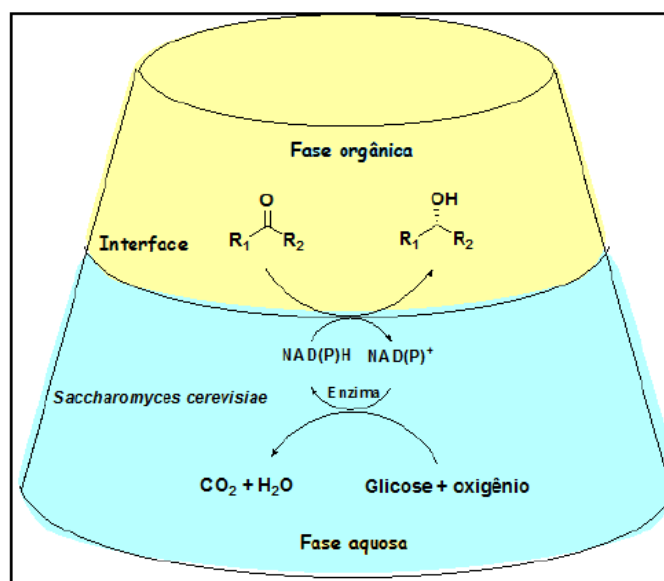
### 4.3.3. Biotransformação com *S. cerevisiae*

Nas reações de biotransformação com FP (*S. cerevisiae*), foram testadas duas estratégias, sendo a primeira o sistema bifásico, similar aos sistemas desenvolvidos pelo grupo anteriormente.<sup>[19],[20]</sup> Depois foram estudados e testados dois sistemas de imobilização para o FP em meio monofásico.

#### 4.3.3.1. Reação em sistema bifásico

Em um erlenmeyer de 125 mL foi adicionado 0,5 mmol das BC's dissolvidas em 18 mL de n-hexano, 42 mL de solução tampão fosfato de potássio/ácido cítrico (pH 3,5-8,5) e 4 g do fermento de pão. Este sistema foi submetido à agitação intensa com temperatura controlada (30-35 °C) por cerca de 24-48h. (**Figura 14**)

Foram retiradas alíquotas da reação periodicamente para controle da reação via CCD e feita a extração final do produto com diclorometano (3 x 15 mL). A formação ou não dos produtos foi acompanhada por análises de IV e RMN-<sup>1</sup>H.



**Figura 14.** Representação de um sistema bifásico.<sup>[13], [19]</sup>

#### ***4.3.3.2. Reação em sistema monofásico com imobilização da BC em papel***

Em um béquer foi adicionado 0,5 mmol da BC e esta foi solubilizada na menor quantidade possível de diclorometano. Depois, com pedaços de papel filtro cortados em aproximadamente 3 cm x 3 cm, a BC solubilizada foi gotejada e após a evaporação do solvente, foi obtido o papel filtro com a BC adsorvida em sua superfície. Estes papeis são novamente cortados em pedaços menores e transferidos para um erlenmeyer de 125 mL. No mesmo erlenmeyer, foi adicionado cerca de 16 mL de n-hexano, 4 mL de DMSO e 4 g do FP. Este sistema foi submetido à agitação intensa com temperatura controlada (30-35 °C) por cerca de 24-48h. Foram retiradas alíquotas da reação periodicamente para controle da reação via CCD (eluente n-hexano/acetato de etila 7:3) e feita a extração final do produto com diclorometano (3 x 15 mL). A formação ou não dos produtos foi acompanhada por análises de IV e RMN-<sup>1</sup>H.

#### ***4.3.3.3. Reações em sistema monofásico com imobilização do FP em microesferas***

Para a preparação das microesferas, foram preparadas duas soluções separadas, sendo uma delas a solução 2% de alginato de sódio com volume total de 100 mL e a outra, uma solução de cloreto de cálcio 2% com volume total de 50 mL. Na primeira solução, foi adicionado 4 g de FP, e a mistura foi solubilizada após 1h com agitação intensa. Essa solução foi então gotejada na de cloreto de cálcio usando uma seringa presa a uma bomba peristáltica, com um volume de gotejamento fixo em 60  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ . As microesferas foram separadas da solução com o auxílio de uma peneira e enxugadas com papel toalha. Em um erlenmeyer de 125 mL foi adicionado 0,5 mmol da BC, 16 mL de n-hexano e 4 mL de DMSO e o sistema foi deixado sob agitação Dubnoff por cerca de 48h a 35 °C. Em um segundo erlenmeyer, foram adicionadas as mesmas quantidades de solventes e substrato, porém com a adição de 2 mL de uma solução de trealose 10% m/v. As microesferas foram retiradas com a ajuda de uma peneira e lavadas com água destilada. A fase

do n-hexano foi transferida para o funil de extração e o produto final foi obtido após a extração com alíquotas de diclorometano (2 x 15 mL). A formação ou não dos produtos foi acompanhada por análises de IV e RMN-<sup>1</sup>H.

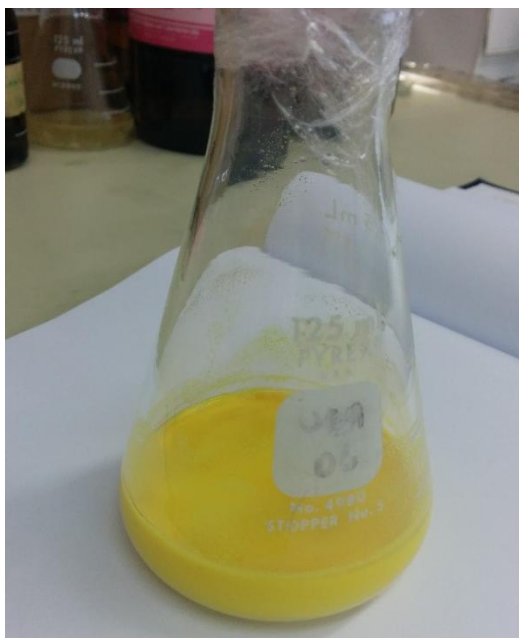
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Síntese das bis-chalconas e redução via NaBH<sub>4</sub>

Foram sintetizadas seis bis-chalconas, sendo apenas uma da série baseada em 1,4-diacetilbenzeno devido à baixa quantidade de reagente disponível para a síntese. Todas as bis-chalconas apresentaram coloração amarela (**Figura 15.**), com variação de tom amarelo mais claro para as bis-chalconas sem substituintes e tom amarelo mais vibrante para as com substituintes. As bis-chalconas, em geral, apresentaram baixa solubilidade em diversos solventes orgânicos testados tais como metanol, etanol, clorofórmio, diclorometano, DMSO, n-hexano, acetato de etila e acetona. Apenas uma bis-chalcona foi considerada um caso extremo, a **8d** (substituinte -3,4-OCH<sub>2</sub>O-), pois não foi solúvel em nenhum solvente orgânico mencionado anteriormente. As sínteses iniciais apresentaram bons valores de rendimento (>84%).

Para a redução *via* NaBH<sub>4</sub>, foram testados dois métodos: com meio etanólico e SiO<sub>2</sub> e com meio metanólico sem adição de SiO<sub>2</sub>. Ambos os métodos se mostraram eficazes na redução das bis-chalconas que foram solubilizadas pelo solvente sob aquecimento (**5a,8a,8b**), porém cada método apresentou uma dificuldade mínima. Ao usar o método EtOH/SiO<sub>2</sub>, o produto reduzido possui cor branca devido à quebra de ressonância entre os anéis aromáticos, ligações duplas e carbonilas. Portanto nesse método é necessário a adição de uma etapa extra para que ocorra a separação correta do produto com a sílica, já que a mesma possui coloração branca também. Com a etapa extra, parte do produto pode ser perdido e o rendimento da reação diminuiu. Ao usar o segundo método (MetOH), o problema está na toxicidade do solvente. Ao inserir um solvente tóxico em uma etapa da reação, está reduzindo o quão “verde” o método é em sua totalidade. A posterior

separação do produto é rápida, sem necessidade de etapas extras comparado ao método com sílica. O rendimento das reduções com  $\text{NaBH}_4$  variou de 29% (**8a**) a 65% (**8b**).



**Figura 15.** Suspensão da bis-chalcona 5a.

Para a caracterização dos compostos via RMN, foi utilizado o RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz e 200 MHz) disponíveis na Central de Análises. Os espectros apresentados mostram a formação dos produtos, com observação em especial dos dois dubletos característicos dos  $\text{H}_\alpha$  e  $\text{H}_\beta$  das bis-chalconas. Os compostos **5a** e **8a** foram utilizados para exemplificar as suas séries e também os correspondentes alcoóis, formados após a redução com  $\text{NaBH}_4$ .

Para o composto **5a**, os sinais dos hidrogênios aromáticos se encontram na faixa de 7,45 à 8,13 ppm. O singlete em 8,13 é referente aos quatro hidrogênios simétricos do anel central, sendo que este se repete em regiões próximas no espectro do **8a**. Nos demais compostos esse singlete está deslocado para a direita (<1 ppm) devido a presença dos diferentes substituintes nas extremidades dos compostos. Os dubletos com  $J = 16$  Hz, são os referentes aos hidrogênios  $\text{H}_\alpha$  e  $\text{H}_\beta$ , no caso o dubleto presente em 7,85 ppm corresponde ao  $\text{H}_\beta$  e em 7,54 ppm ao  $\text{H}_\alpha$ .

Este valor de  $J = 16$  Hz também é característico de chalconas com isomeria *E*. Os demais sinais correspondem aos hidrogênios dos anéis aromáticos com substituintes variáveis, portanto seus deslocamentos também são variáveis para cada composto. A caracterização do álcool é bastante visível, pois ocorre a quebra da ligação dupla  $C=O$ , devido a adição de uma nova ligação  $C-H$  e  $O-H$ . O novo hidrogênio alquílico gera um dubleto na região de 5,21 ppm e  $J = 6$  Hz e o  $H\beta$  sofre um desdobramento de sinal gerando um duplo dubleto na região de 6,20 ppm. O dubleto do  $H\alpha$  é deslocado para a direita ( $\sim 1$  ppm) e ocorreu uma sobreposição dos sinais com os hidrogênios aromáticos, tornando difícil a identificação individual dos mesmos. (Figura 17.)

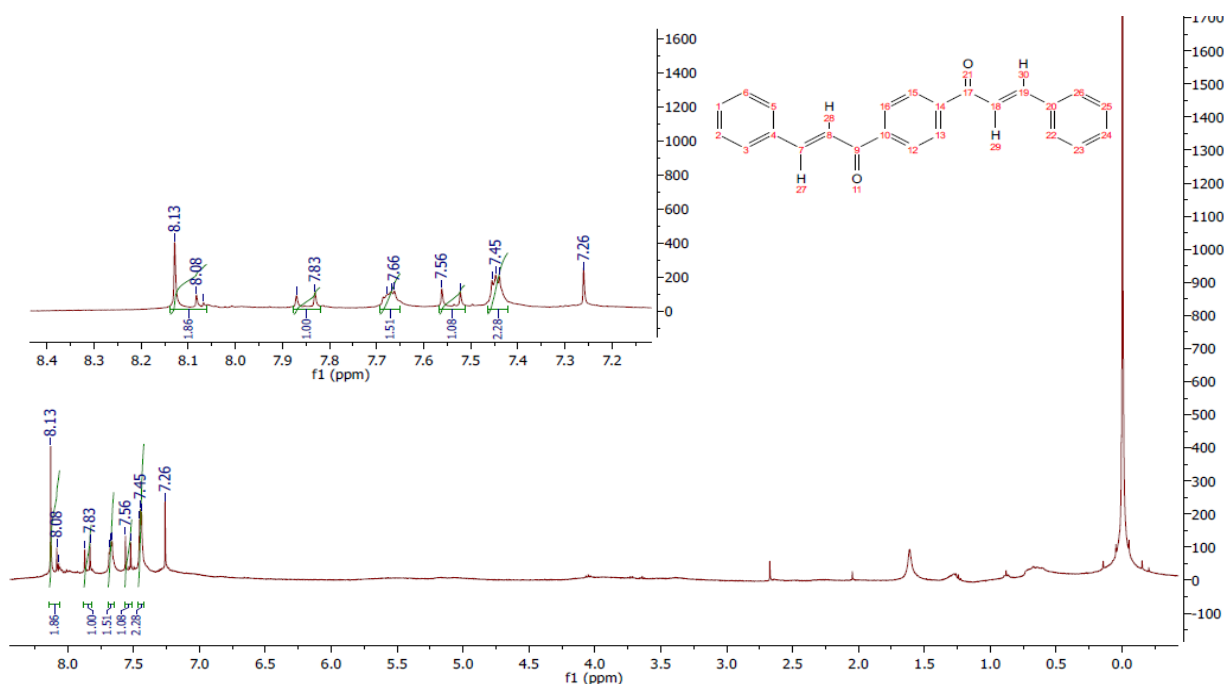
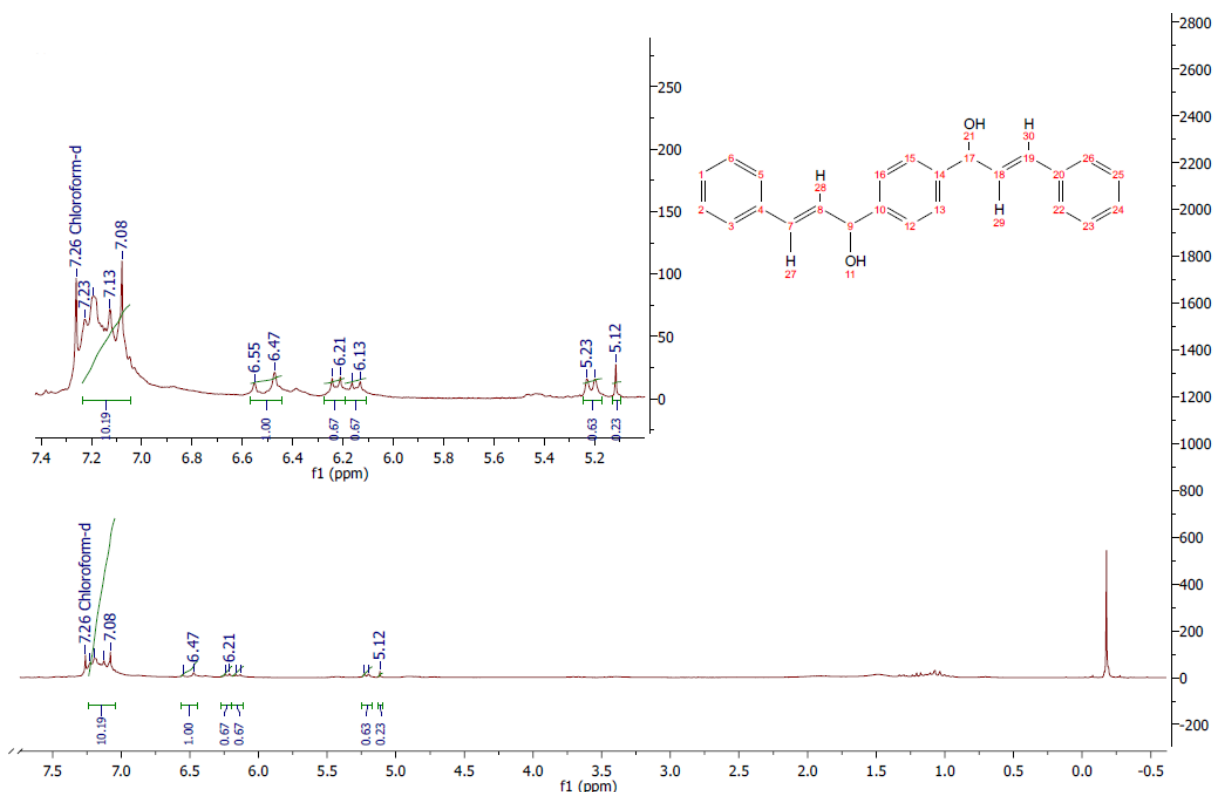


Figura 16. Espectro de RMN -  $^1H$  da BC – 5a. (400 MHz,  $CDCl_3$ ). t = 6h



**Figura 17.** Espectro RMN -  $^1\text{H}$  BC - 5a reduzida com  $\text{NaBH}_4$ . (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $t = 6\text{h}$

Na caracterização por IV, foi elaborada e usada a **Tabela 3**, com os valores de número de onda das bandas características das bis-chalconas baseados em valores citados na literatura.<sup>[26]</sup> (**Tabela 3, Anexo**)

Foi utilizada a bis-chalcona **8b** para demonstrar os resultados obtidos das bandas no IV. No espectro apresentado na **Figura 18**, as bandas em  $2988\text{ cm}^{-1}$  são referentes aos hidrogênios ligados aos anéis aromáticos, as em  $2947$  e  $2830\text{ cm}^{-1}$  são referentes aos  $-\text{CH}_3$  dos grupos metóxi, as pequenas bandas em  $2029$  e  $1974\text{ cm}^{-1}$  são os *overtones* característicos para a presença de anéis aromáticos. A banda em  $1696\text{ cm}^{-1}$  é a indicação clássica de um grupo carbonila, porém de um composto cetona  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado. As demais bandas em  $1662$ ,  $1597$ ,  $1223$ ,  $819$ ,  $715$  e  $648\text{ cm}^{-1}$  são comuns em todas as outras bis-chalconas caracterizadas por IV.

Quando a bis-chalcona é reduzida ao álcool via  $\text{NaBH}_4$ , as alterações no espectro mais significativas são a presença de uma banda forte e larga referente a presença de grupos  $-\text{OH}$  em  $3477\text{ cm}^{-1}$  e a diminuição e/ou ausência da banda da carbonila em  $1696\text{ cm}^{-1}$ , restando apenas uma banda em  $1654\text{ cm}^{-1}$  referente a ligação  $\text{C}=\text{C}$  de um composto carbonílico  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado. (**Figura 19.**)

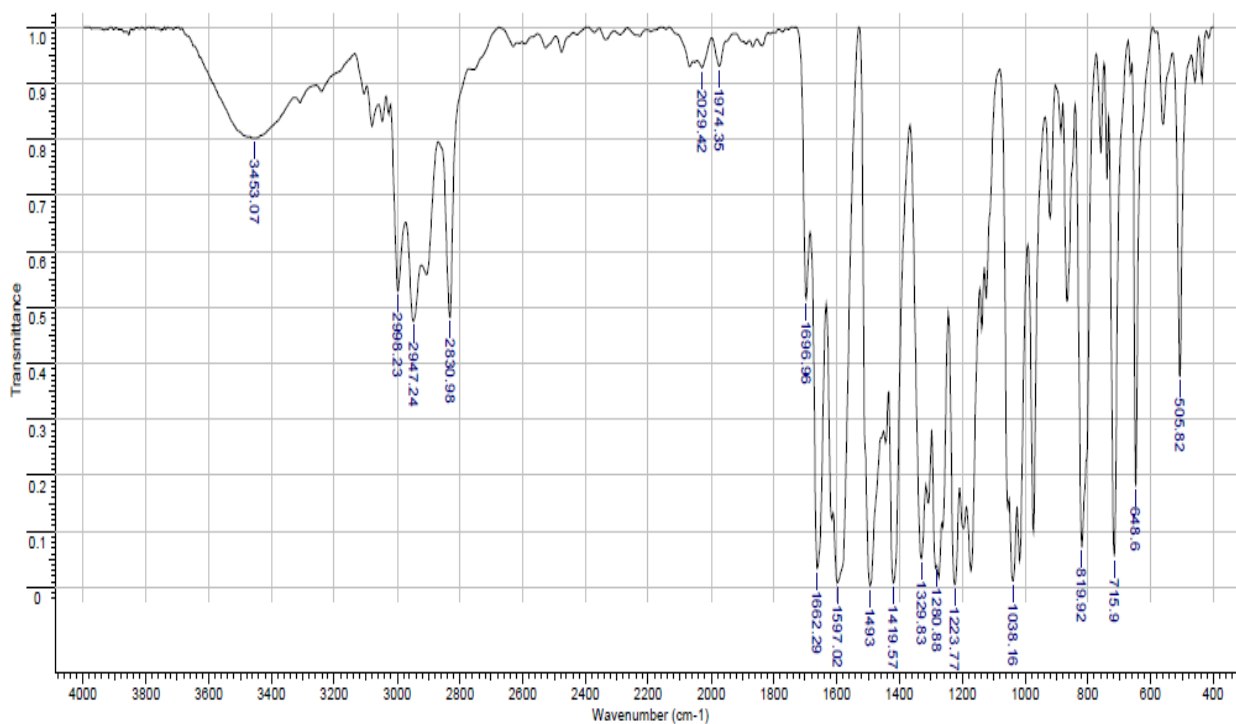


Figura 18. Espectro de IV da bis-chalcona 8b (KBr). t = 6h

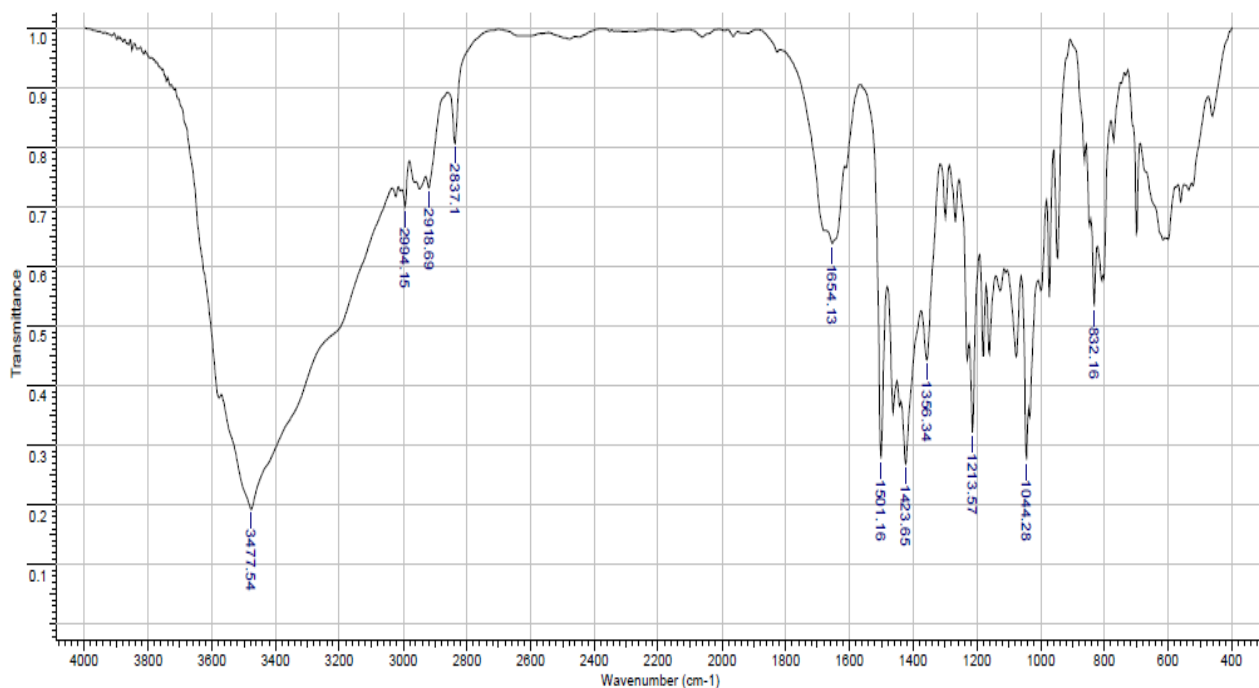
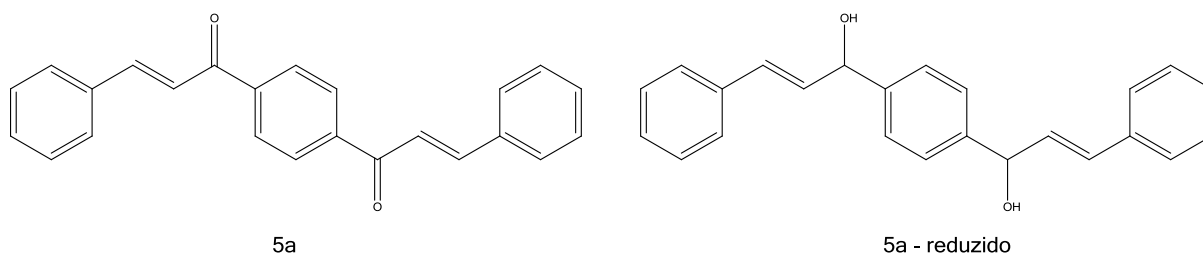


Figura 19. Espectro de IV da bis-chalcona 8b reduzida com NaBH₄ (KBr). t = 6h



A seguir serão apresentados os dados de constantes físicas e os espectroscópicos para a caracterização dos compostos preparados.

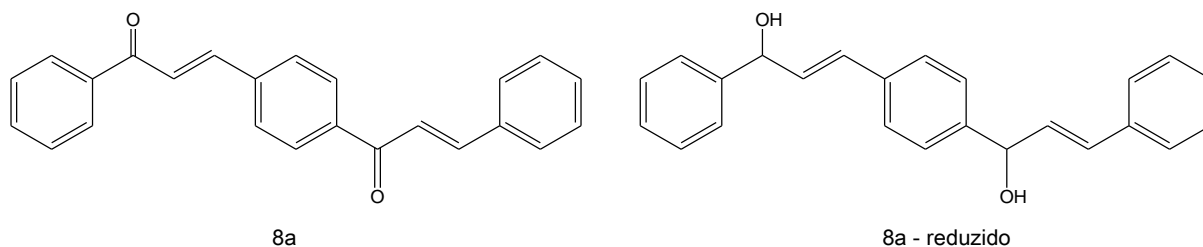
❖ Caracterização da série I (1,4-diacetilbenzeno):



**Figura 20.** Bis-chalcona 5a e o composto reduzido *via* NaBH<sub>4</sub>

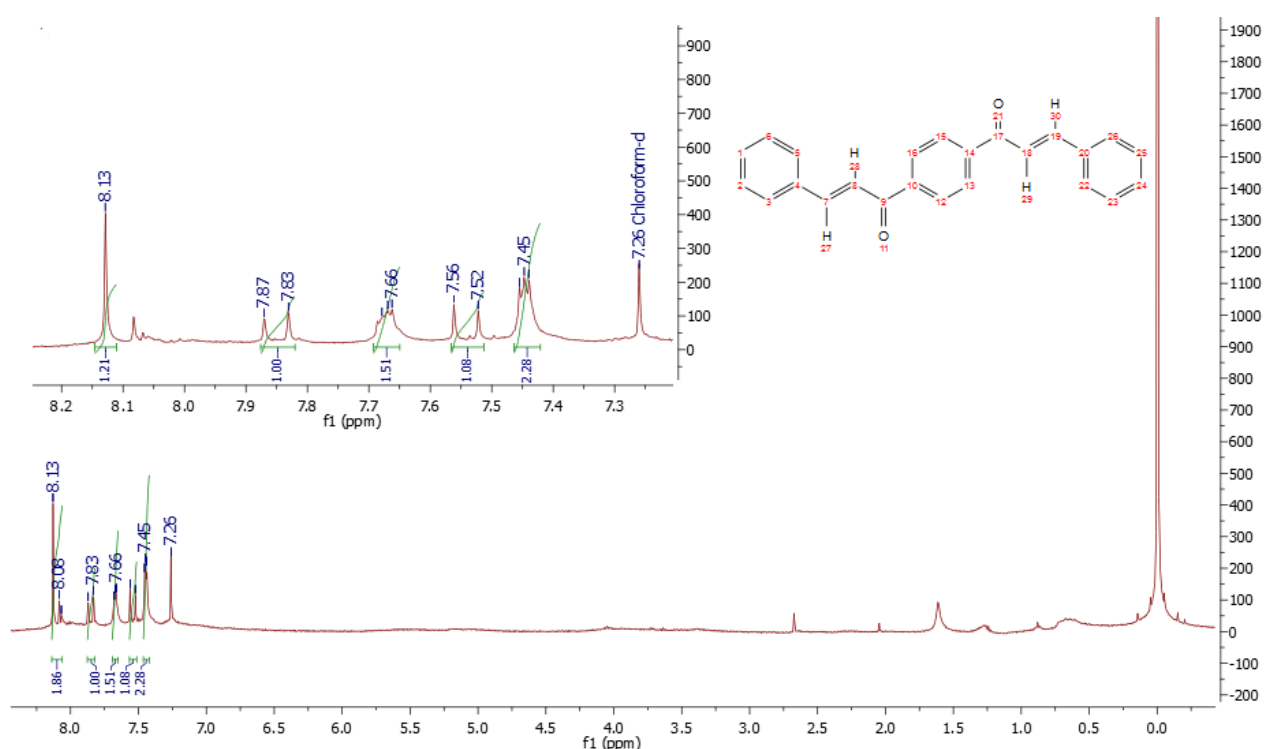
BC 5a	BC 5a - álcool
<b>Massa molar:</b> 338,40 g <b>Rendimento:</b> 84% (não purificado)	<b>Massa molar:</b> 342,43 g <b>Rendimento:</b> 35%
<b>Ponto de fusão:</b> 185 °C (p.f. <sup>lit.</sup> : 200 °C)	<b>Ponto de fusão:</b> > 225 °C
<b>IV</b> (KBr) cm <sup>-1</sup> : 3444 (w) (umidade), 3053 (w), 3036 (w), 1945 (w), 1813 (w), 1682 (s), 1656 (vs), 1599 (vs), 1333 (s), 1223 (s), 983 (m), 754 (s)	<b>IV</b> (KBr) cm <sup>-1</sup> : sem dados
<b>RMN - <sup>1</sup>H</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ/ppm: 8,13 (s, 4H), 7,85 (d, 2H, H <sub>β</sub> , H <sub>β</sub> '', J = 16 Hz), 7,67 (m, 4H), 7,54 (d, 2H, H <sub>α</sub> , H <sub>α</sub> '', J = 16 Hz), 7,45 (m, 6H).	<b>RMN - <sup>1</sup>H</b> (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ/ppm: 7,23-7,08 (m, 14H) 6,51 (d, 2H, J = 16 Hz), 6,20 (dd, 2 H, J = 16 Hz), 5,21 (d, 2H, J = 6 Hz), 5,12 (s, 2H)

❖ Caracterização da série II (tereftaldeído):



**Figura 21.** Bis-chalcona 8a

BC 8a	BC 8a - álcool
<b>Massa molar:</b> 338,40 g <b>Rendimento:</b> 104% (não purificado)	<b>Massa molar:</b> 342,43 g <b>Rendimento:</b> 29%
<b>Ponto de fusão:</b> 173 °C (p.f. <sup>lit.</sup> : 190 °C)	<b>Ponto de fusão:</b> > 225 °C
<b>IV</b> (KBr) $\text{cm}^{-1}$ : 3442 (vw) (umidade), 3053 (w), 3034 (w), 1960 (vw), 1656 (s), 1605 (vs), 1335 (s), 1223 (s), 979 (s), 691 (s)	<b>IV</b> (KBr) $\text{cm}^{-1}$ : 3332 (vs), 3059 (s), 3024 (s), 2920 (m), 2851 (m), 1953 (w), 1890 (w), 1817 (w), 1643 (w), 1601 (s), 1270 (s), 742 (vs), 697 (vs)
<b>RMN - <math>^1\text{H}</math></b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta/\text{ppm}$ : 8,03 (d, 4H, $J = 7,8$ Hz), 7,82 (d, 2H, $\text{H}\beta'$ , $\text{H}\beta''$ , $J = 16$ Hz), 7,71 (s, 4H), 7,79 (d, 2H, $\text{H}\alpha'$ , $\text{H}\alpha''$ , $J = 16$ Hz), 7,53 (dd, 2H, $\text{H}4'$ , $\text{H}4''$ , $J = 8$ Hz)	<b>RMN - <math>^1\text{H}</math></b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta/\text{ppm}$ : 7,44-7,30 (m, 14H), 6,66 (d, 2H, $J = 16$ Hz), 6,38 (dd, 2H, $J = 16$ Hz), 5,38 (d, 2H, $J = 4$ Hz), 5,01 (d, 2H, $J = 8$ Hz)



**Figura 22.** Espectro de RMN -  $^1\text{H}$  da BC - 8a. (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). t = 6h

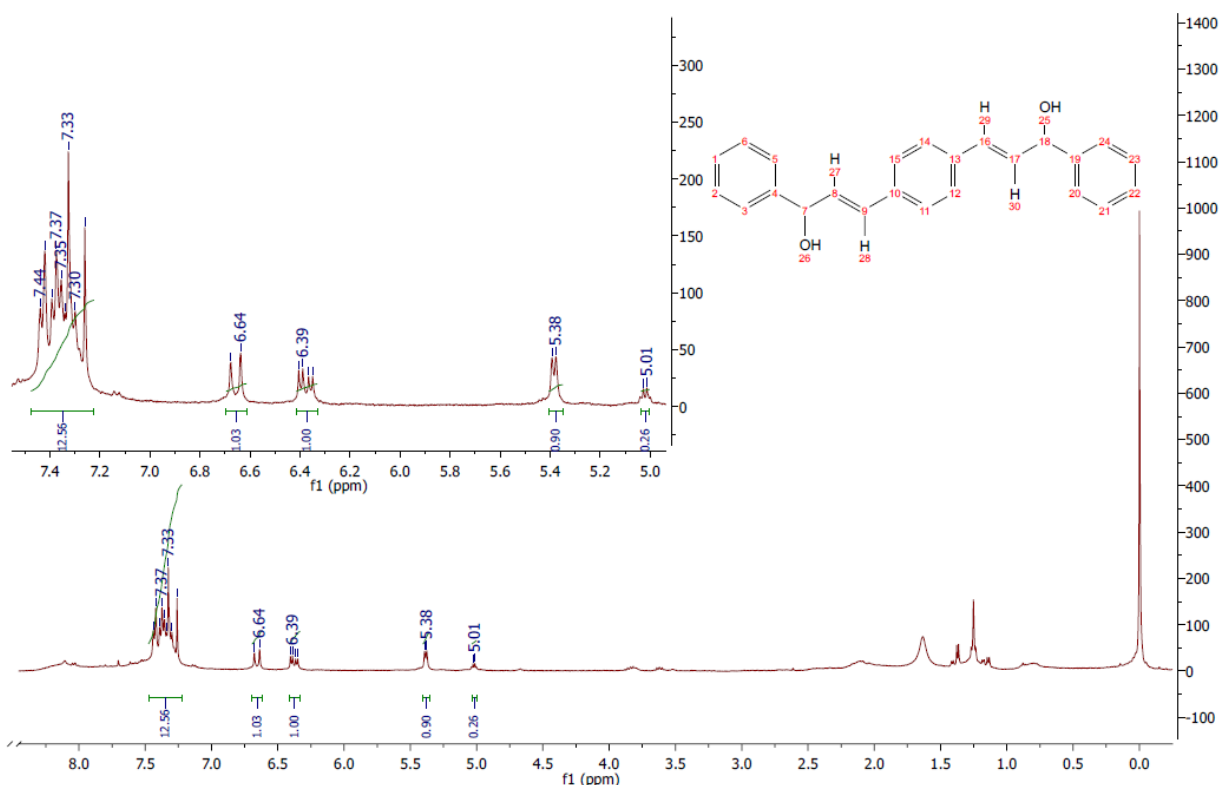


Figura 23. Espectro de RMN -  $^1\text{H}$  da BC – 8a reduzida com  $\text{NaBH}_4$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). t = 6h

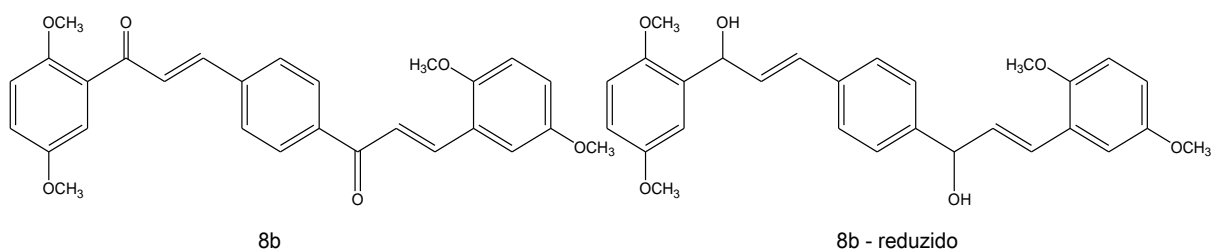
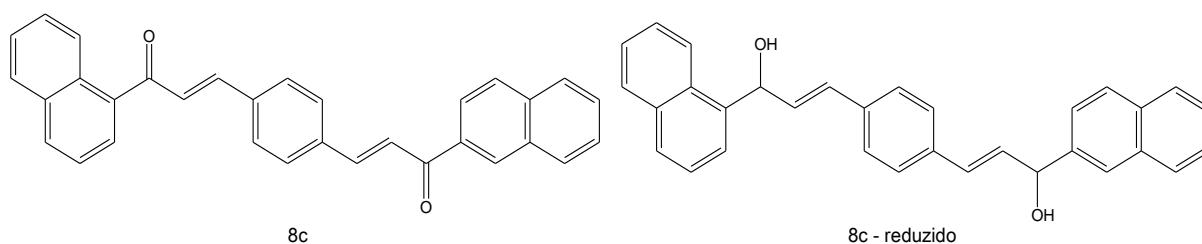


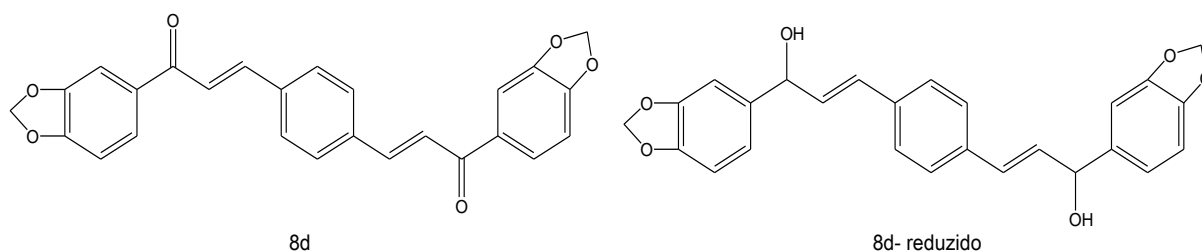
Figura 24. Bis-chalcona 8b

BC 8b	BC 8b - álcool
<b>Massa molar:</b> 458,50 g <b>Rendimento:</b> 93% (não purificado)	<b>Massa molar:</b> 462,52 g <b>Rendimento:</b> 65%
<b>Ponto de fusão:</b> 142 °C (p.f. lit.: 160 °C)	<b>Ponto de fusão:</b> > 200 °C
<b>IV (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>:</b> 3453 (w) (umidade), 2988 (m), 2947 (m), 2830 (m), 2029 (vw), 1974 (vw), 1696 (m), 1662 (vs), 1597 (vs), 1223 (vs), 819 (vs), 715 (vs), 648 (s)	<b>IV (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>:</b> 3477 (vs), 2994 (m), 2918 (m), 2871 (w), 1654 (m), 1501 (s), 1423 (vs), 1213 (s), 832 (s)
<b>RMN - <math>^1\text{H}</math></b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta/\text{ppm}$ : 7,65 (d, 2H, $\text{H}\beta'$ , $\text{H}\beta''$ , J = 16 Hz), 7,62 (s, 4H), 7,48 (d, 2H, $\text{H}\alpha'$ , $\text{H}\alpha''$ , J = 16 Hz), 7,21 (d, 2H, J = 3,0 Hz), 7,05 (dd, 2H, J = 9,0 Hz, J = 3,0 Hz), 6,95 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 3,82 (d, 6H, o-OCH <sub>3</sub> , mOCH <sub>3</sub> ).	<b>RMN - <math>^1\text{H}</math></b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta/\text{ppm}$ : 7,31 (s, 4H), 6,94 (d, 2H), 6,83 (m, 4H) 6,61 (d, 2H, J = 16 Hz), 6,43 (dd, 2H, 16 Hz), 3,83 (s, 2H ) 3,77 (s, 12H) OH não visível



**Figura 25.** Bis-chalcona 8c

BC 8c	BC 8c - álcool
<b>Massa molar:</b> 438,52 g <b>Rendimento:</b> 101% (não purificado)	<b>Massa molar:</b> 442,55 g <b>Rendimento:</b> 34%
<b>Ponto de fusão:</b> 204 °C (p.f. <sup>lit.</sup> : 229 °C)	<b>Ponto de fusão:</b> > 225 °C
<b>IV (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>:</b> 3422 (w), 3053 (w), 1927 (vw), 1833 (vw), 1658 (vs), 1605 (vs), 1182 (vs), 817 (vs), 746 (s)	<b>IV (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>:</b> 3318 (vs), 3051 (s), 3024 (s), 2916 (s), 1913 (w), 1803 (w), 1631 (m), 1599 (s), 1270 (s), 1070 (s), 819 (vs), 748 (vs)
<b>RMN - <math>^1\text{H}</math></b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ /ppm: baixa resolução (solubilidade)	<b>RMN - <math>^1\text{H}</math></b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ /ppm: baixa resolução (solubilidade)



**Figura 26.** Bis-chalcona 8d

BC 8d	BC 8d - álcool
<b>Massa molar:</b> 426,42 g <b>Rendimento:</b> 100% (não purificado)	<b>Massa molar:</b> 430,45 g
<b>Ponto de fusão:</b> p.f. <sup>lit.</sup> : 274-275 °C	<b>Ponto de fusão:</b> -
<b>IV (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>:</b> 3444 (vw) (umidade), 3083 (vw), 2910 (w), 2786 (vw), 2045 (vw), 1856 (vw), 1652 (vs), 1590 (vs), 1248 (vs), 1040 (vs), 809 (vs)	<b>IV (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>:</b> Não foi possível de reduzir via $\text{NaBH}_4$
<b>RMN - <math>^1\text{H}</math></b> (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) $\delta$ /ppm: 8,03 (d, 2H, J = 16 Hz), 7,99 (s, 6H), 7,92 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,74 (d, 2H, J = 16 Hz), 7,11 (d, 2H, 8 Hz), 6,18 (s, 4H)	<b>RMN - <math>^1\text{H}</math></b> (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) $\delta$ /ppm: Não foi possível de reduzir via $\text{NaBH}_4$

Após a preparação e caracterização das bis-chalconas e de seus padrões alcóolicos, foram realizados os estudos de biorredução com fermento de pão.

## 5.2. Biotransformação com o fermento biológico de pão (*S. cerevisiae*)

### 5.2.1. Primeiros testes

A bis-chalcona **8a** foi selecionada para realização dos testes iniciais de biotransformação, que foram iniciados utilizando o sistema bifásico já testado pelo grupo anteriormente <sup>[19],[20]</sup>. A escolha da bis-chalcona **8a** foi devido ao fato de que essa bis-chalcona não apresenta grupos substituintes e também podia ser obtida em maiores quantidades, portanto seria a melhor para otimização do sistema de biotransformação.

Para os testes com o sistema bifásico n-hexano/tampão de fosfato de potássio (pH = 6), pouco produto foi obtido. A BC **8a** possui baixa solubilidade em n-hexano, e, portanto, mesmo com agitação intensa a interação entre o fermento de pão dissolvido na fase aquosa e a bis-chalcona foi baixa. Outro problema com esse sistema foi a extração do produto no funil de separação, pois ocorreu a formação de uma emulsão entre as fases quando foi adicionado CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, solvente no qual o produto seria solúvel e teria afinidade para migrar de fases. A proposta de usar o sistema bifásico com o tampão foi descartada, e foi utilizada uma nova metodologia com sistema monofásico utilizando co-solventes. Os co-solventes escolhidos foram o DMSO e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, devido à maior solubilidade que a bis-chalcona apresentava nesses solventes. O sistema monofásico também apresentou dificuldades para extração do produto, pois o FP “aglutinou” após agitação na fase de n-hexano, necessitando ser filtrado antes de a fase orgânica ser colocada no funil de separação. Para os testes com DMSO, ocorreram as seguintes dificuldades:

- O sistema monofásico pode ser contaminado com água devido à alta capacidade higroscópica do DMSO, gerando nas extrações um sistema

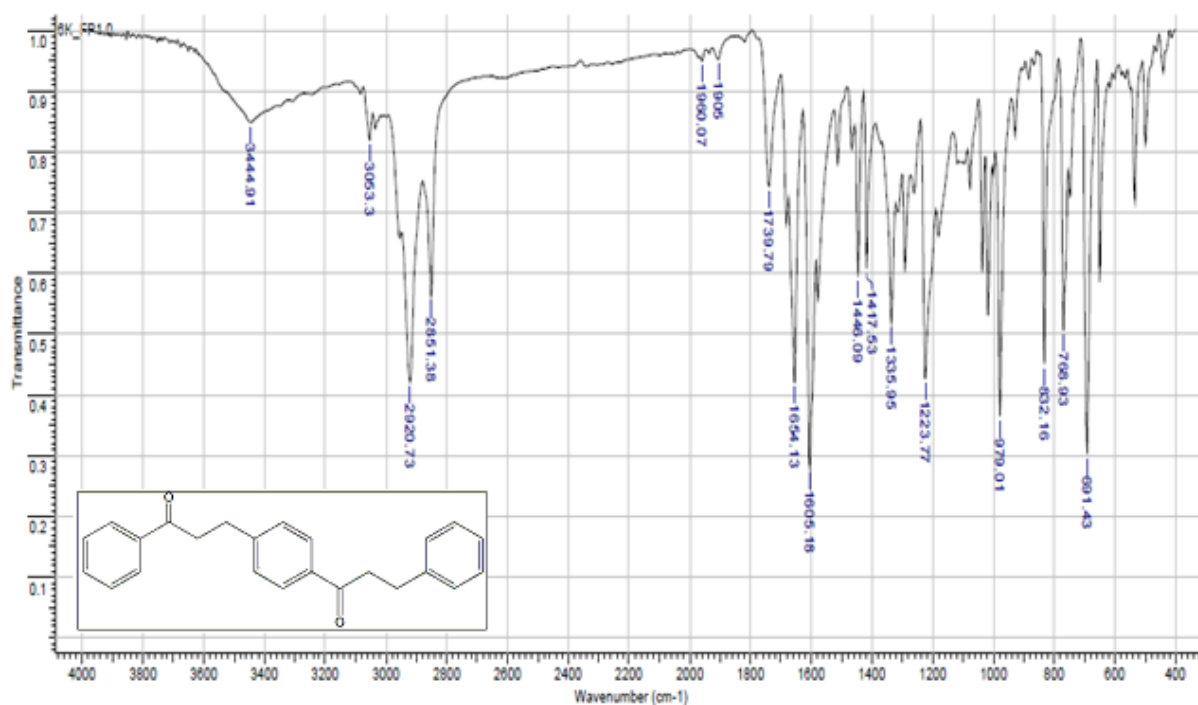
trifásico com uma fase de emulsão na interface entre o n-hexano e o  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  utilizado para extração. **(Figura 27.)**



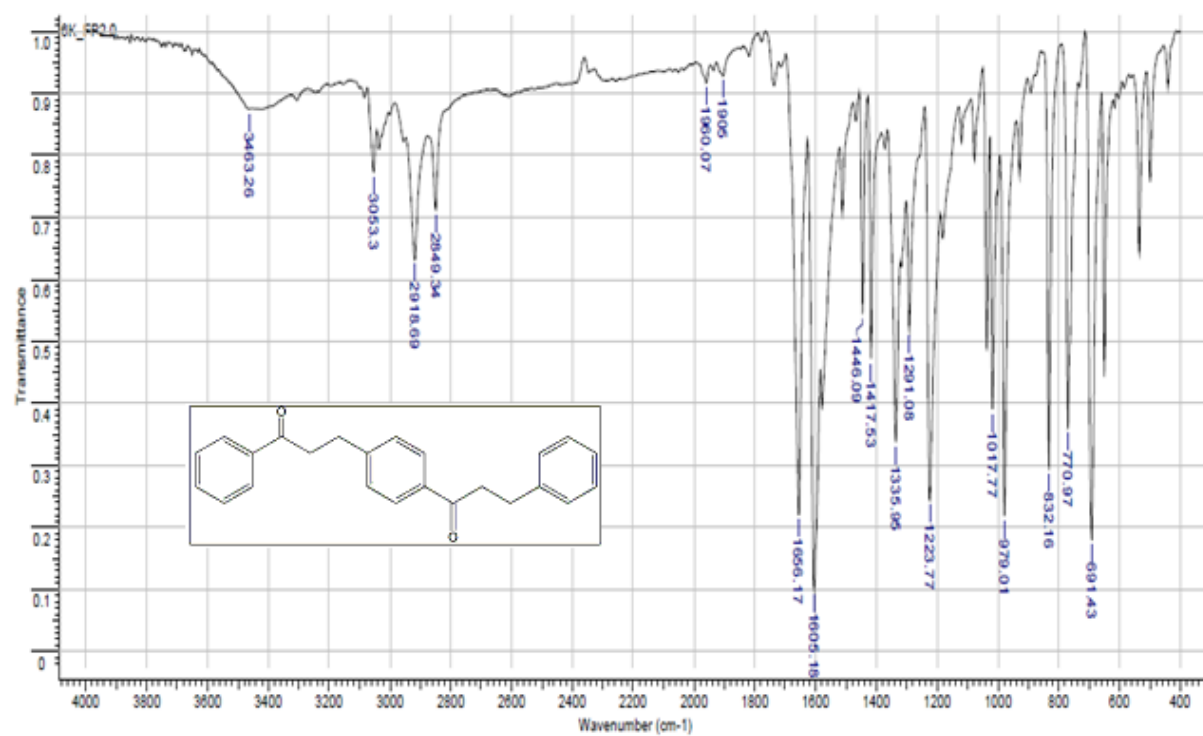
**Figura 27.** Sistema trifásico resultante da tentativa de extração do produto entre n-hexano, DMSO e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

- Em algumas tentativas após a extração, parte do DMSO passou para a fase do  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  junto com o produto, o que acarretou em uma secagem de solvente com falhas, já que o DMSO não pode ser removido facilmente com sistema de rota-evaporação. Assim, o produto não pode ser facilmente caracterizado *via* IV ou RMN de  $^1\text{H}$ .

Para os testes utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , o sistema monofásico não apresentou as mesmas dificuldades, porém devido a toxicidade de solventes orgânicos clorados é possível que as leveduras presentes no FP tenham perdido sua atividade catalítica. A caracterização dos produtos obtidos por estes métodos está apresentada nas **Figuras 28, 29 e 30.**

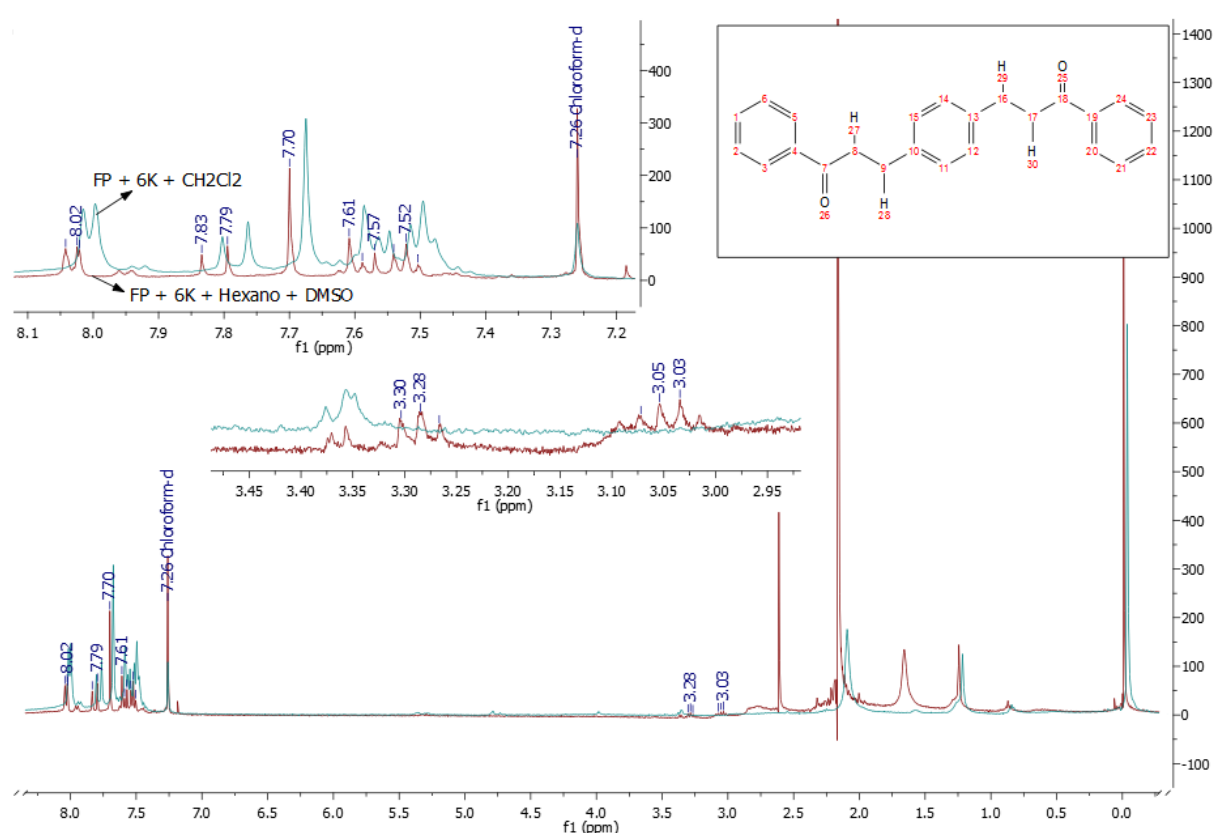


**Figura 28.** Espectro de IV da BC 8a biorreduzido com FP em n-hexano com DMSO (KBr). t = 24h



**Figura 29.** Espectro de IV da BC 8a biorreduzido com FP em n-hexano com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (KBr). t = 24h

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , é importante observar o surgimento de dois tripletos na região de 3,0 – 3,3 ppm, pois os mesmos são picos que ajudam a caracterizar a redução da ligação dupla  $\text{C}=\text{C}$ . Além deles, é importante calcular a constante de acoplamento  $J$  entre os  $\text{H}_\alpha$  e  $\text{H}_\beta$ , pois se o valor dos mesmos continuar igual a 16 Hz então parte do composto ainda não foi reduzido. Na **Figura 28**, os dois espectros foram sobrepostos para demonstrar a eficiência dos dois diferentes métodos. Ao usar o método com DMSO, observam-se dos dois tripletos na região de 3,0 - 3,3 ppm, porém os dubletos característicos das bis-chalconas ainda estão presentes, indicando a redução incompleta de todo o substrato.



**Figura 28.** Espectro de RMN -  $^1\text{H}$  da BC – 8a biorreduzida com FP em meio de n-hexano com co-solventes variados. (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $t = 24\text{h}$

Ao usar o método com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , a BC **8a** não foi reduzida em nenhum grupo (carbonila ou a  $\text{C}=\text{C}$ ), o que confirma que a utilização de solventes clorados é tóxica para o fermento biológico e, portanto, não foi possível que ocorresse a biorredução.

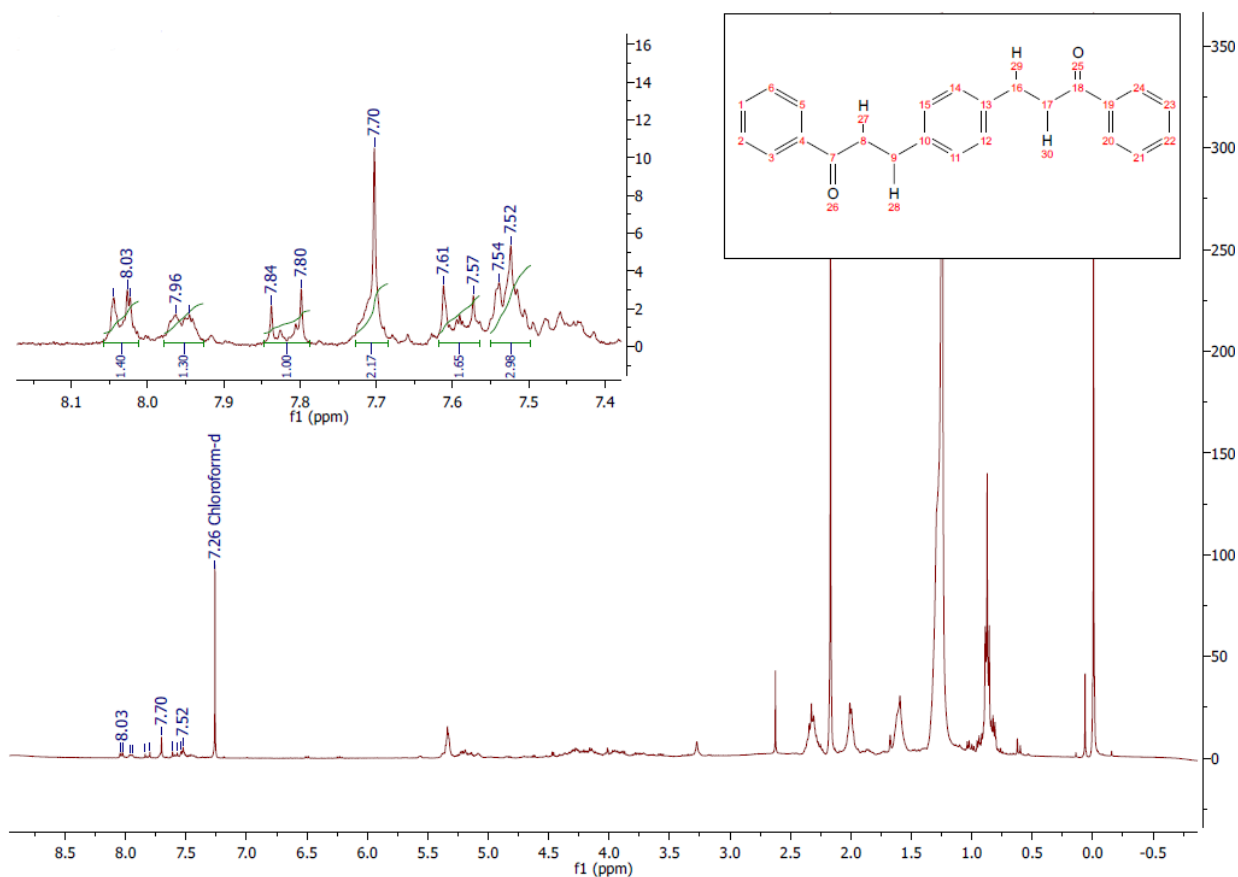
Nos espectros de IV também há a confirmação de uma biorredução incompleta em meio de n-hexano com DMSO quando comparado ao n-hexano com



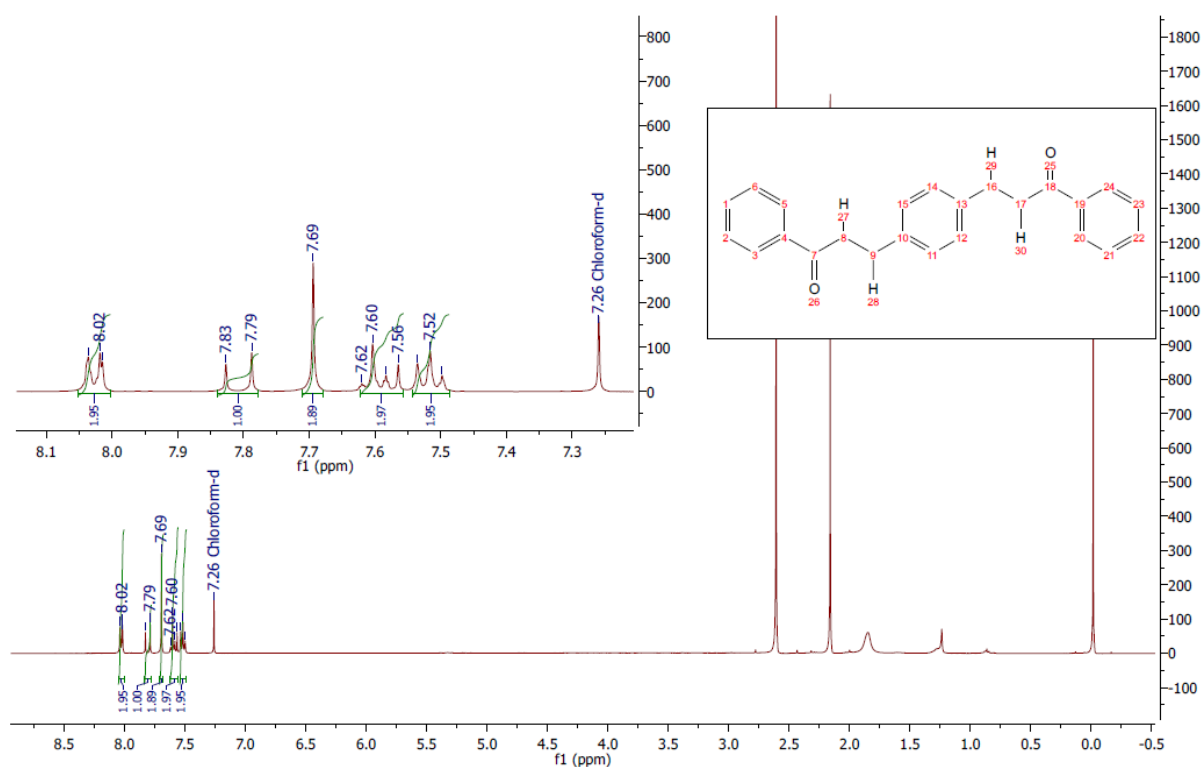
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, pois ocorreu o aumento da banda característica de C-H alifático em 2920 cm<sup>-1</sup>. Mesmo com as dificuldades de extração do co-solvente DMSO, este foi escolhido para avaliar a influência da imobilização da BC ou do FP.

### 5.2.2. Testes de imobilização da BC em papel de filtro e do FP em alginato de cálcio

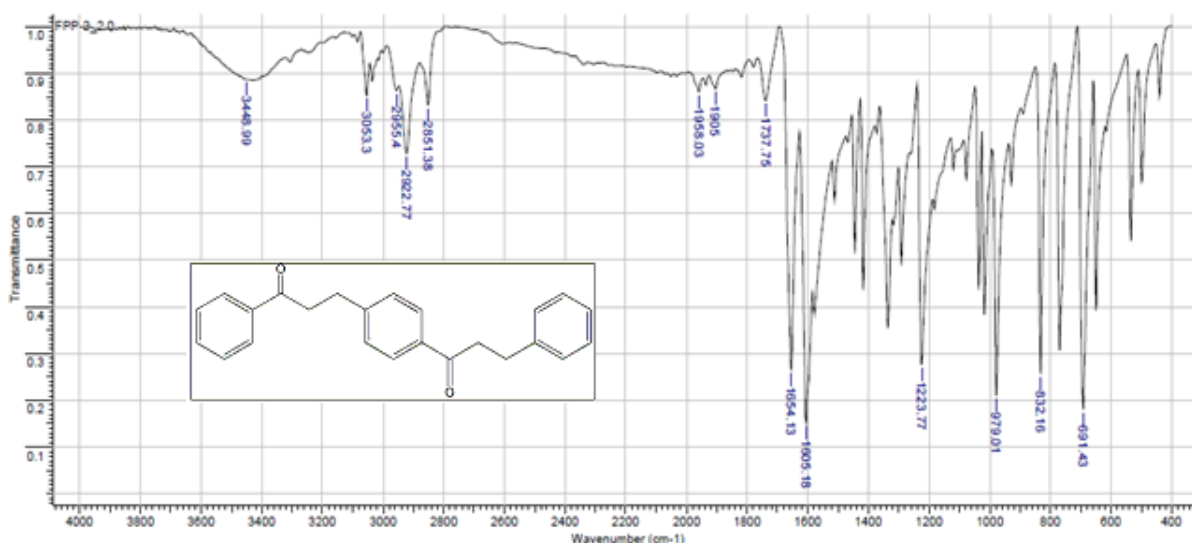
Com base em técnicas utilizadas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Paulo J. S. Moran (UNICAMP) <sup>[27]</sup> e com auxílio do Prof. Dr. Alexandre Parize (UFSC), foram realizados testes utilizando técnicas de imobilização com papel filtro e em microesferas de alginato de cálcio. A imobilização do substrato (BC 8a) em papel filtro é prática, porém tornou-se um pouco complicada a sua separação do meio, pois os papéis ao final da reação ficaram misturados ao FP que está aglomerado. O esperado era que com a imobilização do substrato em pequenos pedaços de papel filtro, este fosse mantido em contato com o FP por mais tempo. Porém, após as análises por RMN-<sup>1</sup>H e IV, foi comprovado que a imobilização do substrato no papel não mostrou grande eficiência para gerar produtos biorreduzidos, sendo avaliada a presença de produto na fase de n-hexano (**Figura 31.**), que foi facilmente retirada por decantação e da fase de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (**Figura 32 e 33**), para remover o substrato que estava imobilizado no papel filtro. Nos espectros de RMN-<sup>1</sup>H, não foi observado a presença de tripletos na região de 3,0 – 3,5 ppm e no espectro de IV verifica-se uma banda pequena em 2851 cm<sup>-1</sup>, que pode ser referente à biorredução da C=C, porém com uma conversão muito baixa.



**Figura 29.** Espectro de RMN -  $^1\text{H}$  da BC 8a imobilizada em papel filtro e biorreduzida com FP, fase n-hexano. (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). t = 48h

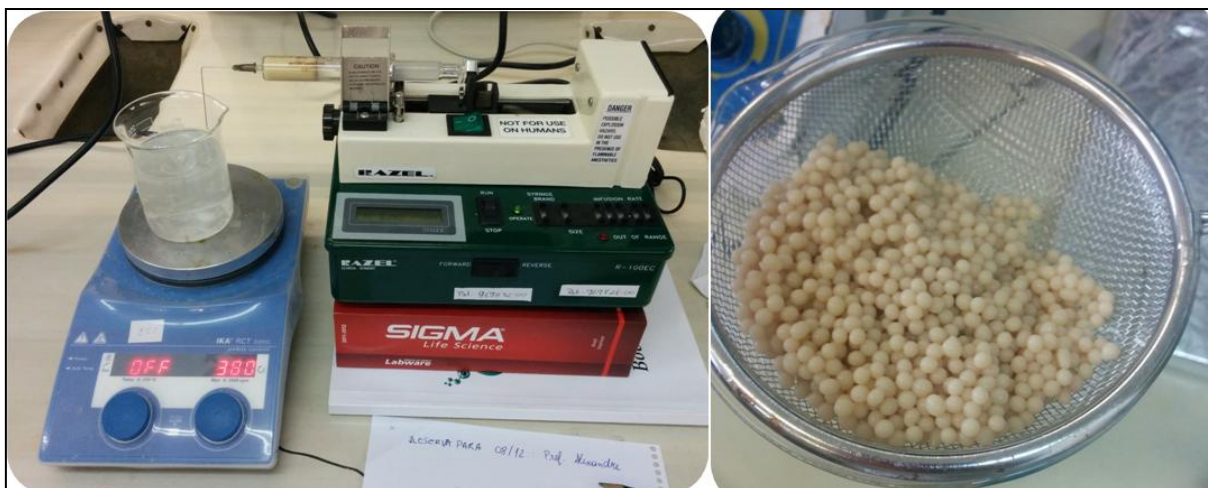


**Figura 32.** Espectro de RMN -  $^1\text{H}$  da BC 8a imobilizada em papel filtro e biorreduzida com FP, fase  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). t = 48h



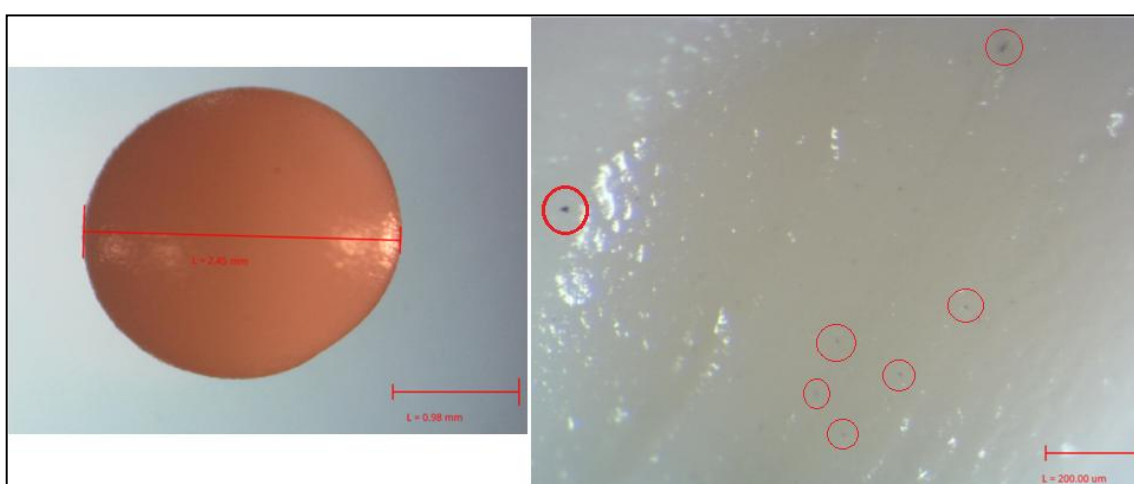
**Figura 30.** Espectro de IV (KBr) da BC 8a imobilizada em papel filtro e biorreduzida com FP, fase de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. t = 48h

Para a produção das microesferas de alginato de cálcio, foi utilizada uma seringa com uma agulha curvada acoplada a uma bomba peristáltica que possui controle de volume por gota. Foram feitos dois tipos de microesferas, sendo um com volumes variados feitos a mão com pipeta Pasteur e com volume controlado de 60 µL para comparação de atividade catalítica, pois o esperado é que com volume menor, a área superficial da microesfera seja relativamente maior e, portanto, sua atividade catalítica deverá ser maior devido as interações superficiais com o substrato. (**Figura 31**).

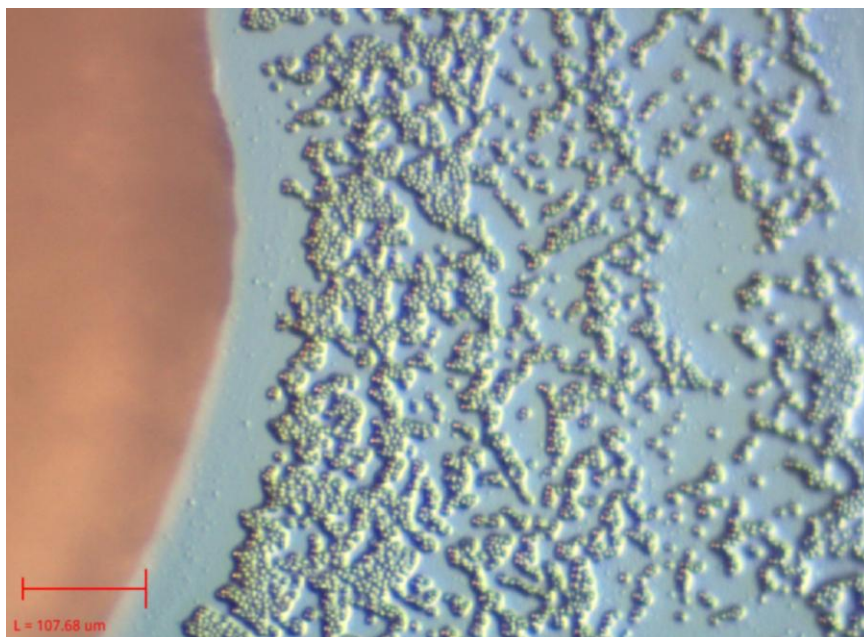


**Figura 31.** Preparação das microesferas de alginato de cálcio com bomba peristáltica e a forma final da microesfera.

Foram realizadas microscopias das esferas (**Figura 32.**) para determinar os seus diâmetros e confirmar o aprisionamento do FP. O diâmetro médio das microesferas com volume controlado é de 2,5 mm e o FP se encontra espalhado pela superfície e pelo interior da microesfera, sendo identificado como pontos pretos. A microesfera ao ser esmagada entre lamínulas de microscopia libera água, e é possível observar a liberação do FP junto da água, sendo este mais um indício de que o FP de pão foi incorporado nas microesferas de alginato de cálcio (**Figura 33.**).

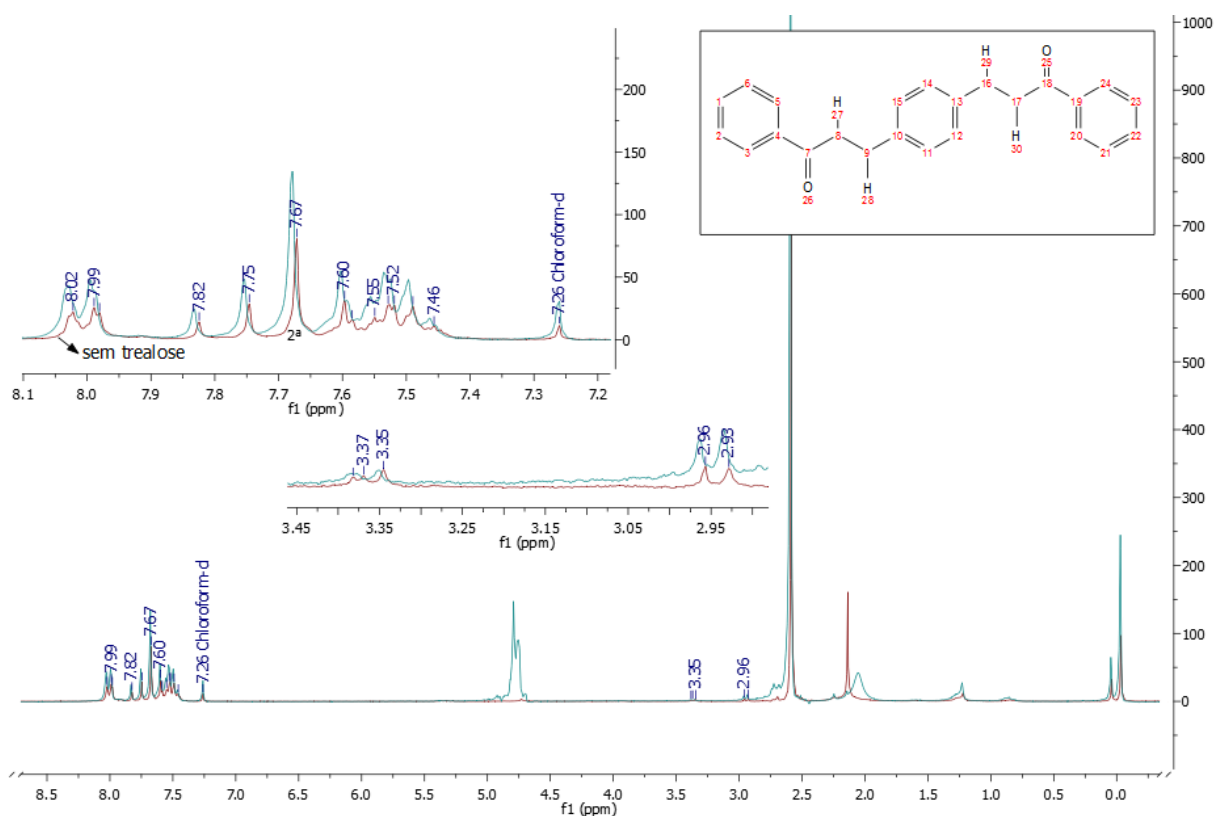


**Figura 32.** Microscopia da microesfera inteira (2,45 mm) e de corte (200  $\mu$ m) com a parte interior da microesfera.

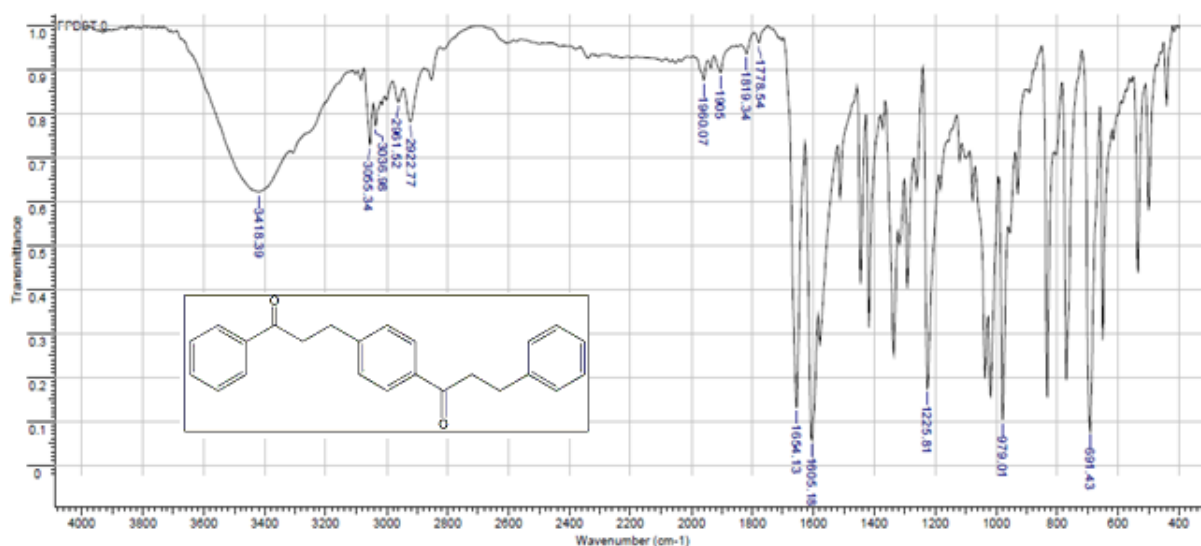


**Figura 33.** Microscopia da microesfera espremida com liberação de água e de FP. (107,68 μm).

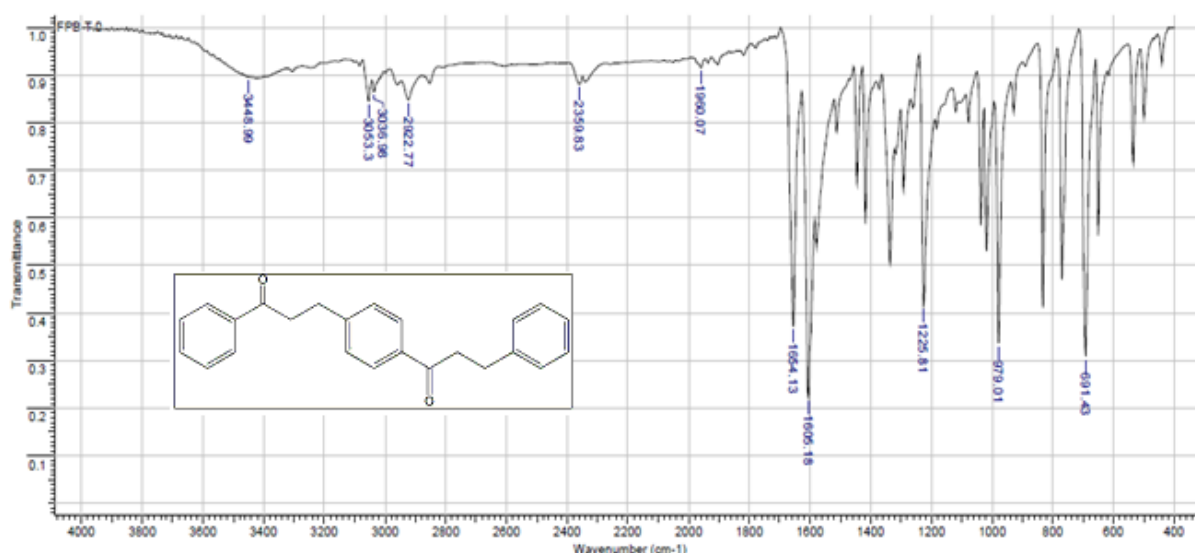
O estudo sobre a eficácia do método com microesferas, nas reações de biorredução de **8a**, foi acompanhado por RMN-<sup>1</sup>H e IV, sendo os resultados apresentados nas **Figuras 34,35 e 36**. Em ambas as análises há a comprovação de que usando este método de biorredução houve baixa conversão do substrato ao produto, sendo esta ainda melhor para o método sem a trealose, pois reduz a dificuldade de extração quando não há solvente aquoso junto ao meio reacional.



**Figura 34.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da BC 8a biorreduzida com FP imobilizado em microesferas (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  
t = 48h



**Figura 35.** Espectro de IV da BC 8a biorreduzida com FP imobilizada em microesferas e sem trealose (KBr). t = 48h



**Figura 36.** Espectro de IV da BC 8a biorreduzida com FP imobilizada em microesferas e com trealose (KBr). t = 48h

Os resultados obtidos mostraram que a **BC 8a** foi reduzida parcialmente e seletivamente na ligação C=C, sendo possível realizar outros estudos com as seguintes variáveis: temperatura, tempo de reação, massa do biocatalisador, grupos substituintes e nível de reticulação das microesferas. Foi possível realizar a imobilização de **FP** em microesferas de alginato de cálcio na tentativa de melhorar os resultados da biorredução das **BC**, sendo a baixa solubilidade dos substratos o problema central deste trabalho.

## 6. CONCLUSÕES

As sínteses realizadas das bis-chalconas ocorreram de forma simples, prática e com rendimentos satisfatórios. As bis-chalconas e os seus padrões reduzidos foram devidamente caracterizadas por RMN-<sup>1</sup>H e IV. Dentro dos métodos testados de biorredução, o que recebeu mais enfoque foi a imobilização do **FP** em alginato de cálcio, pois este mostrou-se promissor e inovador para o grupo de pesquisa, sendo este método responsável por contornar algumas dificuldades encontradas ao longo das atividades. Foi observada a redução quimiosseletiva das ligações insaturadas

C=C, demonstrando que o uso de células íntegras como as presentes no **FP** podem ser utilizadas como uma alternativa viável e de baixo custo para redução de compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados. Para este projeto ainda há diversas variáveis para serem estudadas e otimizadas para obtenção de maiores conversões, mantendo a quimiosseletividade, e posteriormente ganhando escopo em diversos substituintes nos produtos-alvo.

O aprendizado ao longo do curso e principalmente dentro dos estágios I e II foi de extremo valor, sendo este utilizado para o desenvolvimento deste projeto.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAIRD, C.; CANN, M. **Environmental Chemistry**. 5th. ed. New York: W. H. Freeman, 2012.
2. ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. 1st. ed. [S.l.]: Oxford University Press, 2000.
3. WONG, C.-H.; WHITESIDES, G. M. **Enzymes in Synthetic Organic Chemistry**. 1st. ed. Oxford: Pergamon, 1994.
4. BRUICE, P. Y. **Organic Chemistry**. 7th. ed.: Pearson Education International, 2013.
5. PRIZE, N. The Nobel Prize in Chemistry 1912. Disponível em: <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prize/chemistry/laureates/1912](http://www.nobelprize.org/nobel_prize/chemistry/laureates/1912)>. Acesso em: 5 Junho 2015.
6. MANUAL, O. T. Petroleum Refining Process. Disponível em: <[https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm\\_iv/otm\\_iv\\_2.html#3](https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_iv/otm_iv_2.html#3)>. Acesso em: 5 Junho 2015.
7. NORMANN, W.; SCHUCKMANN, G. V. **Hydrogenation of Higher Fatty Acids**. 2,127,367, 16 August 1938. (Patente)
8. CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2nd. ed.: Oxford University Press, 2012.
9. PRESS, T. N. A. **Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Disposal of Chemicals.**, 1995. Disponível em: <[http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=4911&page=370](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=4911&page=370)>. Acesso em: 6 Junho 2015.
10. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6th. ed.: W. H. Freeman, 2012.
11. RSBC. The first Jack bean urease (*Canavalia ensiformis*) complex obtained at 1.52 resolution, 2012. Disponível em:

- <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4H9M>>. Acesso em: 30 Outubro 2015.
12. KOOLMAN, J.; ROEHM, K.-H. **Color Atlas of Biochemistry**. 2nd. ed. Stuttgart: Thieme, 2005.
  13. FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6th. ed.: Springer, 2011.
  14. DERMIBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 14-34, 2009.
  15. HOURNAL, T. W. S. Levis Heir Chose Genes Over Jeans, as Pathbreaking Scientist and Educator, 2007. Disponível em: <<http://www.wsj.com/articles/SB118559171788881054#koshland.html>>. Acesso em: 6 Junho 2015.
  16. DATABASE, E. Enzyme Count. Disponível em: <<http://www.enzyme-database.org/stats.php>>. Acesso em: 28 Outubro 2015.
  17. OLIVEIRA, L. G. D.; MANTOVANI, S. M. Transformações Biológicas: Contribuições e Perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.
  18. DRAUZ, K.; GRÖGER, H.; MAY, O. **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis**. 1st. ed.: Wiley-VCH, 2012.
  19. SCHAEFER, C. A. **Biotransformação de compostos carbonílicos com microorganismos em sistema aquoso e/ou bifásico**. Florianópolis: UFSC-CFM, 2015.
  20. SILVA, D.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. D. G. Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, n. 3-4, p. 157-163, Maio 2010.
  21. NEDOVIC, V.; WILLAERT, R. **Focus on Biotechnology: Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology**. 1st. ed.: Springer Science+Business Media, v. 8A,

2004.

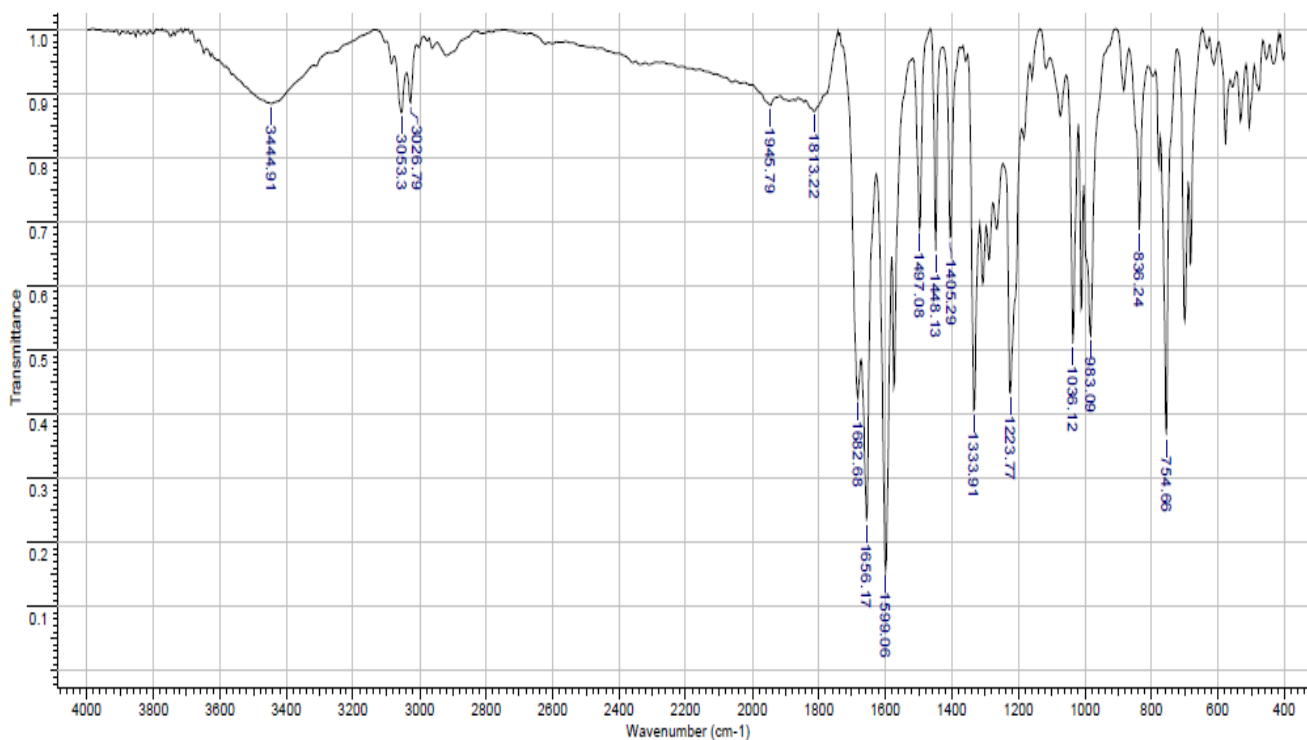
22. MILAGRE, H. M. S. et al. Asymmetric Bioreduction of Ethyl 3-Halo-2-oxo-4-phenylbutanoate by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized in Ca-Alginate Beads with Double Gel Layer. **Organic Process Research & Development**, n. 10, p. 611-617, 2006.
23. MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 98, p. 69-114, Junho 2015.
24. NEUENFELDT, P. D. **Planejamento, Síntese e Avaliação Biológica de Derivados Pirazolínicos e Bis-Chalconas Simétricas**: Estudos de Correlação Estrutura/Atividade. Florianópolis: UFSC-CFM, 2015.
25. MODZELEWSKA, A. et al. Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 3491-3495, Maio 2006.
26. WILLIAMS, D. H.; FLEMING, I. **Spectroscopic methods in organic chemistry**. 4th. ed.: McGraw-Hill Book Company (UK) Limited, 1987.
27. PAULA, B. R. S. D. **Estudos de reações enzimáticas de alcenos ativados**. 1st. ed. Campinas: UNICAMP, 2015.
28. DRAUZ, K.; WALDMANN, H. **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook**. 2nd. ed.: Wiley - VCH, 2002.

## ANEXO DOS DADOS ESPECTROSCÓPICOS E ESPECTROS DE RMN – $^1\text{H}$ e IV.

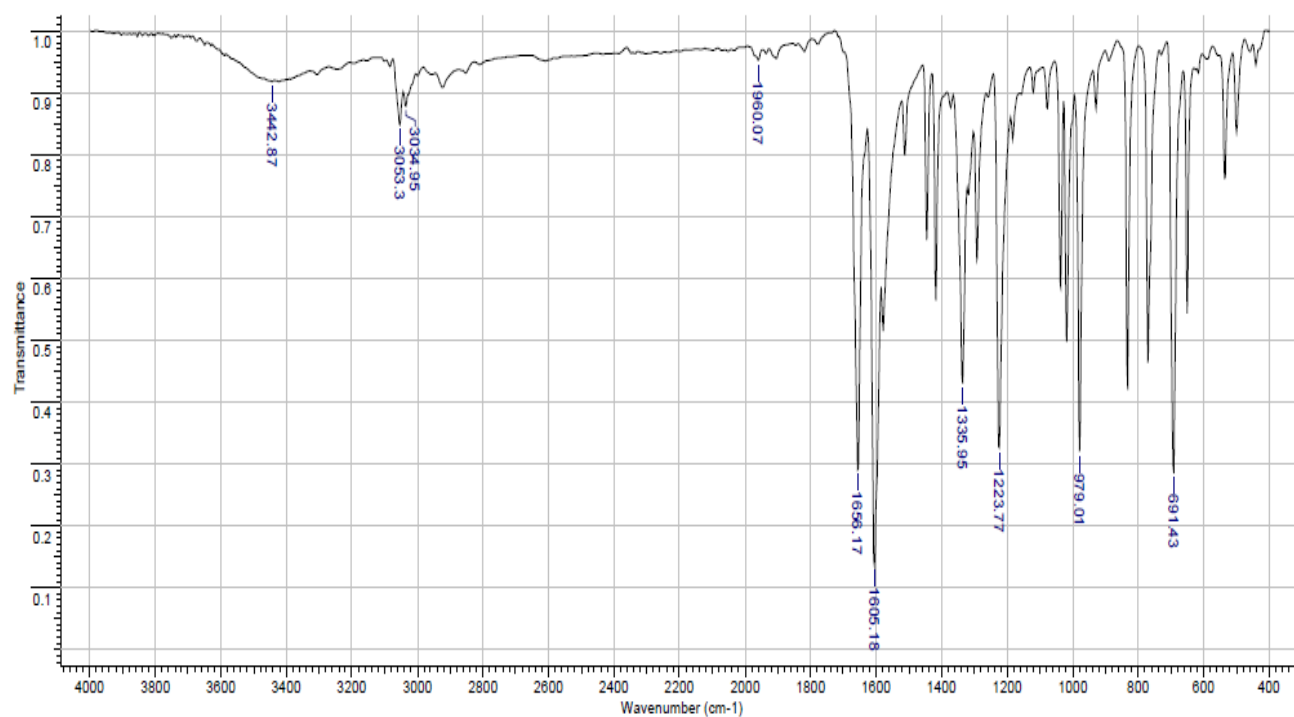
**Tabela 3.** Bandas de IV [26]

Grupo	Banda* ( $\text{cm}^{-1}$ )
O-H	3600 – 3200 (s)
H-arílico	3040 – 3010 (w)
$-\text{CH}_2$ , $-\text{CH}_3$	2960 – 2850 (s)
Overtone do benzeno	2000 – 1600
C=O (cetona) $\alpha\beta$ -insaturada	1685 – 1665 (s)
C=C de compostos carbonílicos $\alpha\beta$ -insaturados	1640 – 1590 (s)
C-O de todas as classes	1300 – 1050 (s)
$\text{R}' - \text{C}=\text{C} - \text{R}''$ (trans)	990 – 960 (s)
Benzeno monosubstituído	770-730 (s) e 720 – 680 (s)

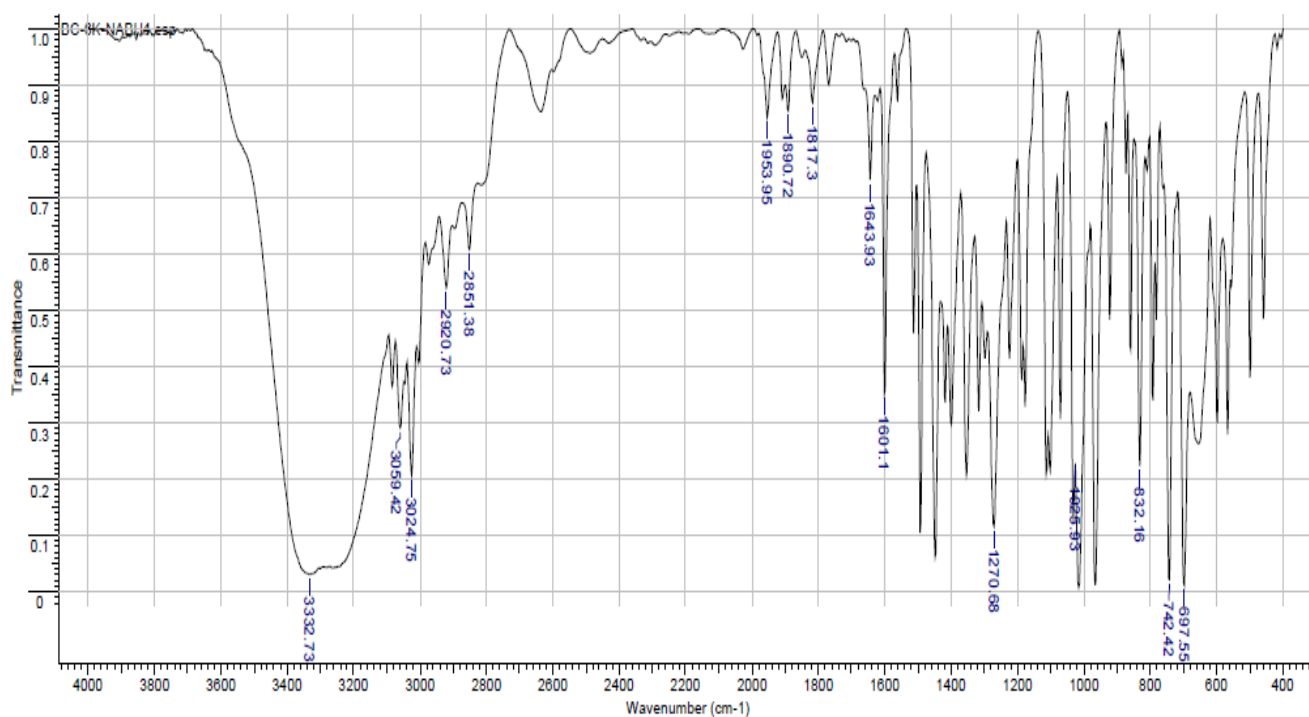
\* Intensidade da banda: (vs) *very strong*, (s) = *strong*, (m) = *medium*, (vw) *very weak*, (w) = *weak*.



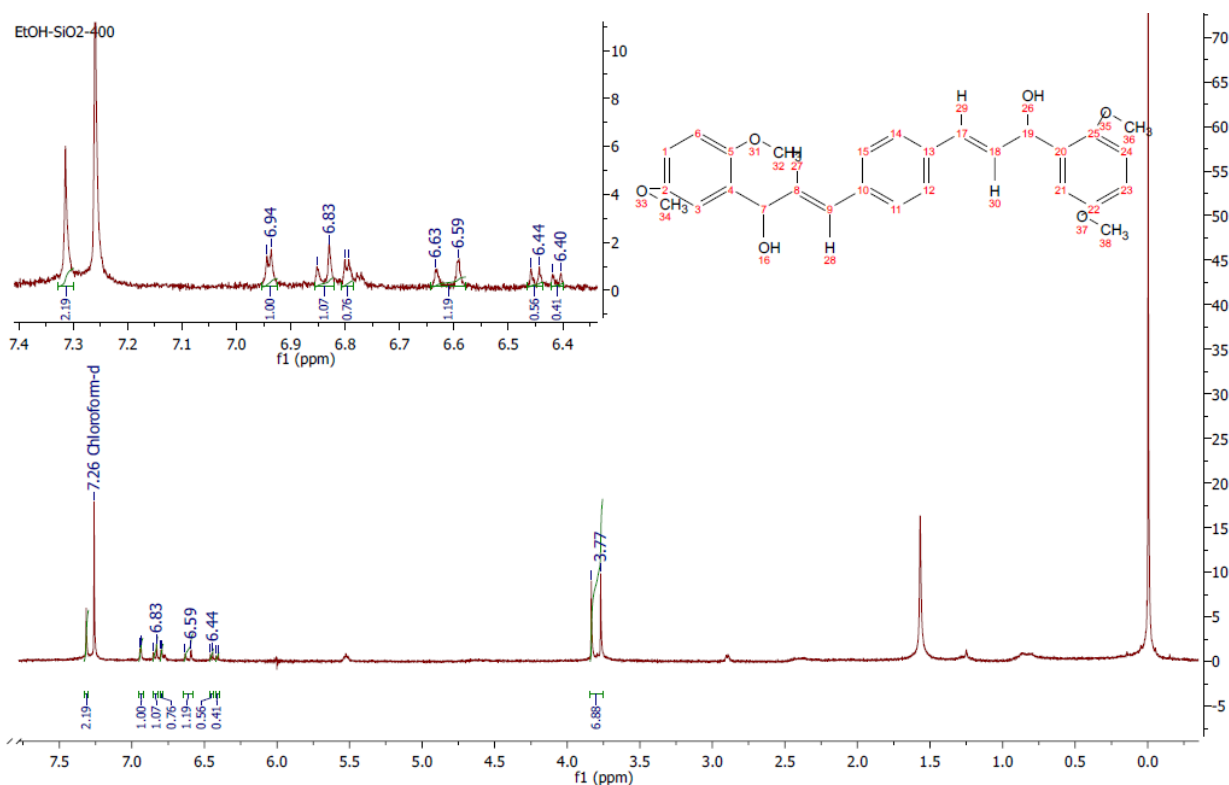
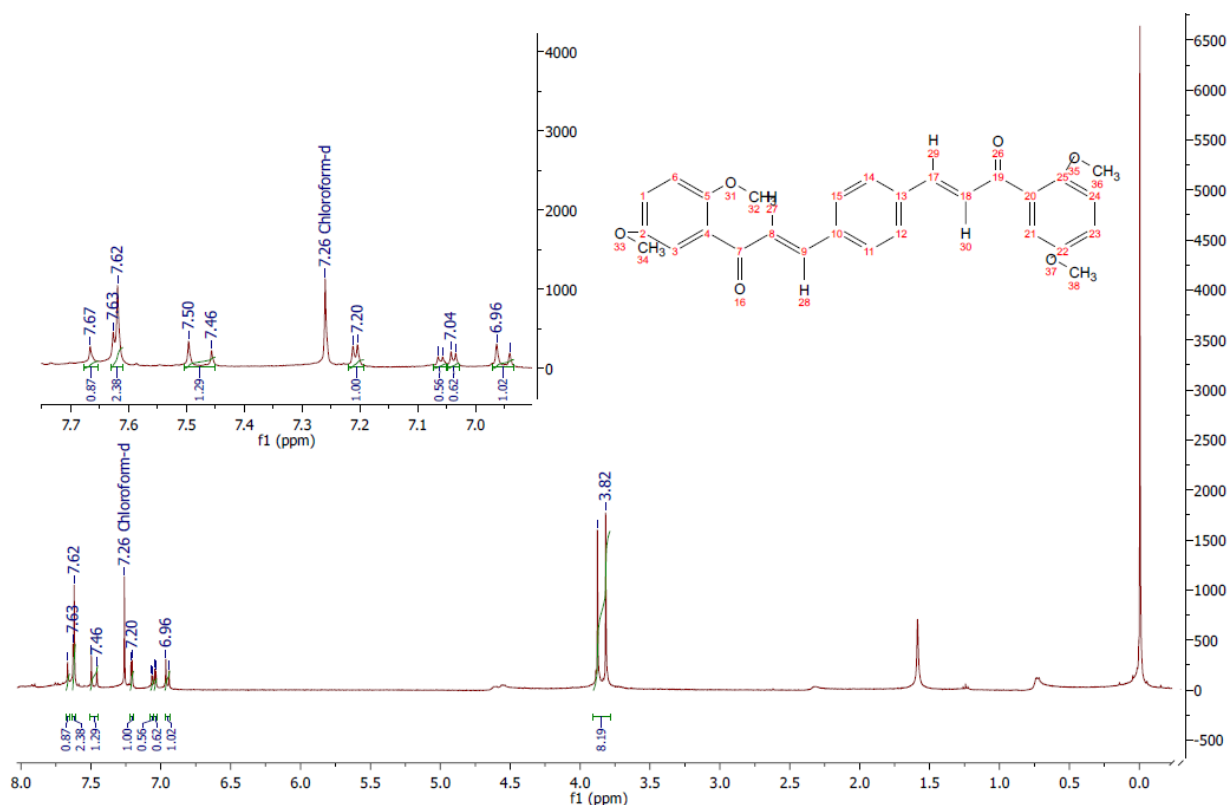
**Figura 37.** Espectro de IV da BC 5a (KBr). t = 6h

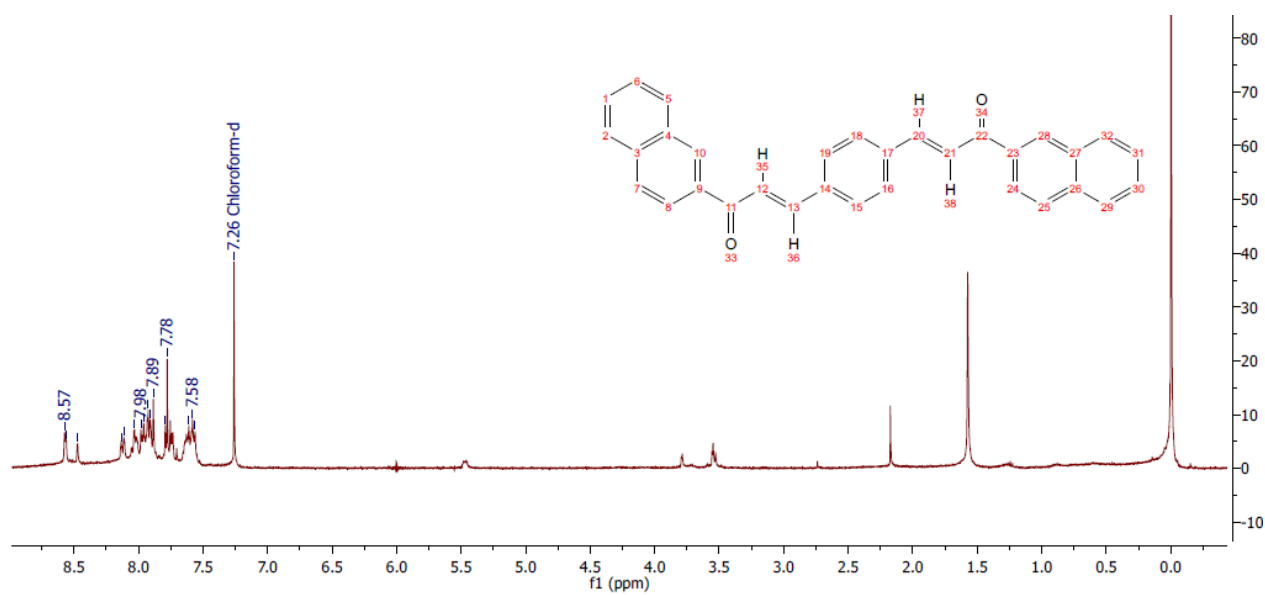


**Figura 38.** Espectro de IV da BC 8a (KBr). t = 6h

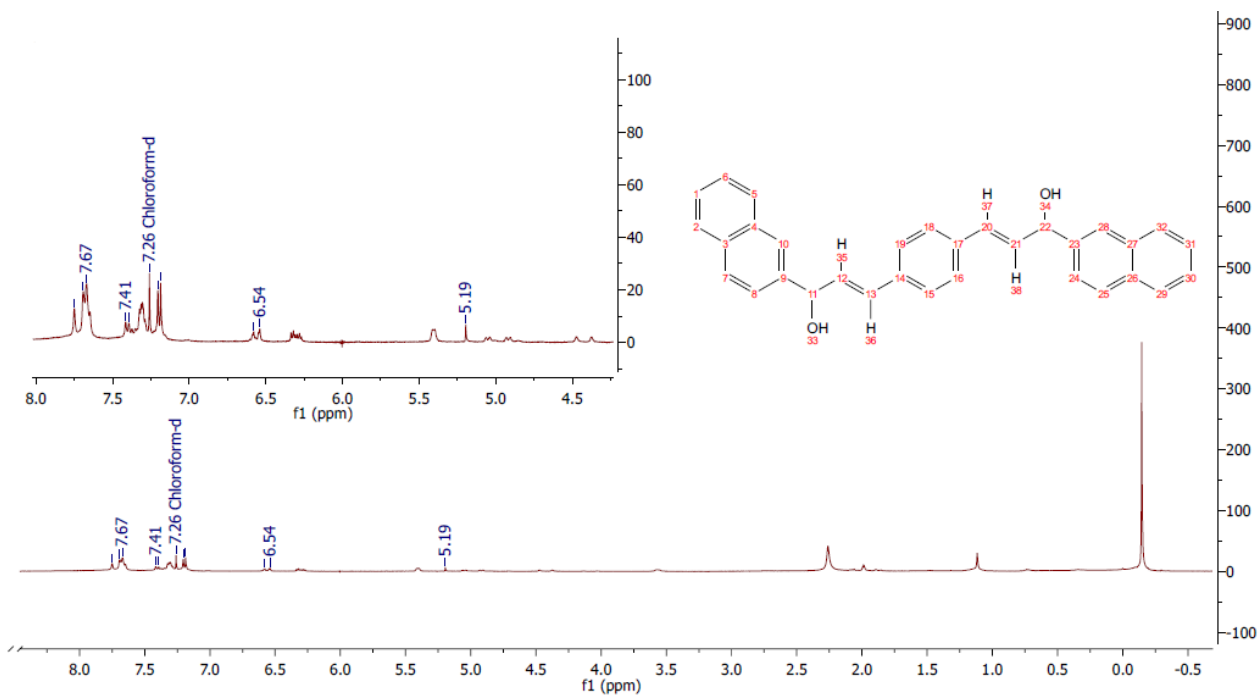


**Figura 39.** Espectro de IV da BC 8a reduzido com NaBH<sub>4</sub> (KBr). t = 6h

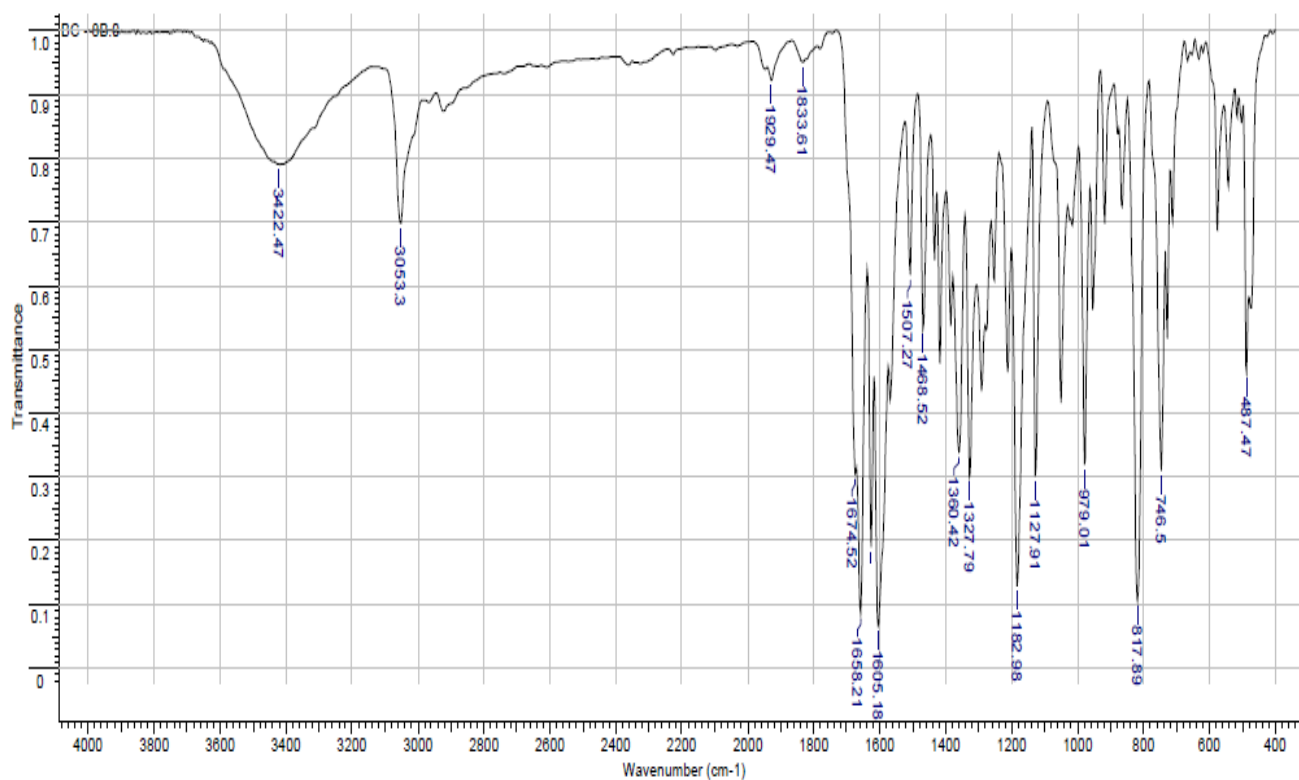




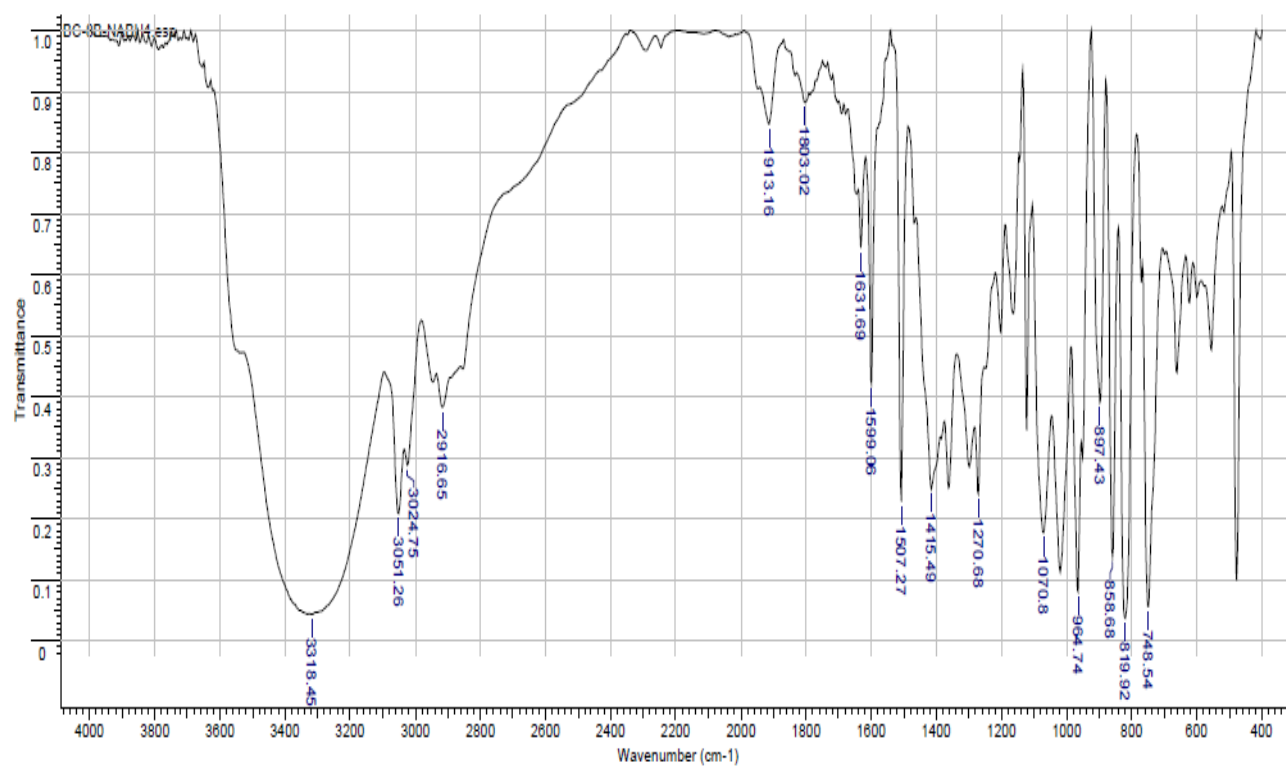
**Figura 42.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da BC 8c. (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). t = 6h



**Figura 43.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da BC 8c reduzida com  $\text{NaBH}_4$ . (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). t = 6h



**Figura 44.** Espectro de IV da BC 8c (KBr). t = 6h



**Figura 45.** Espectro de IV da BC 8a reduzido com NaBH₄ (KBr). t = 6h



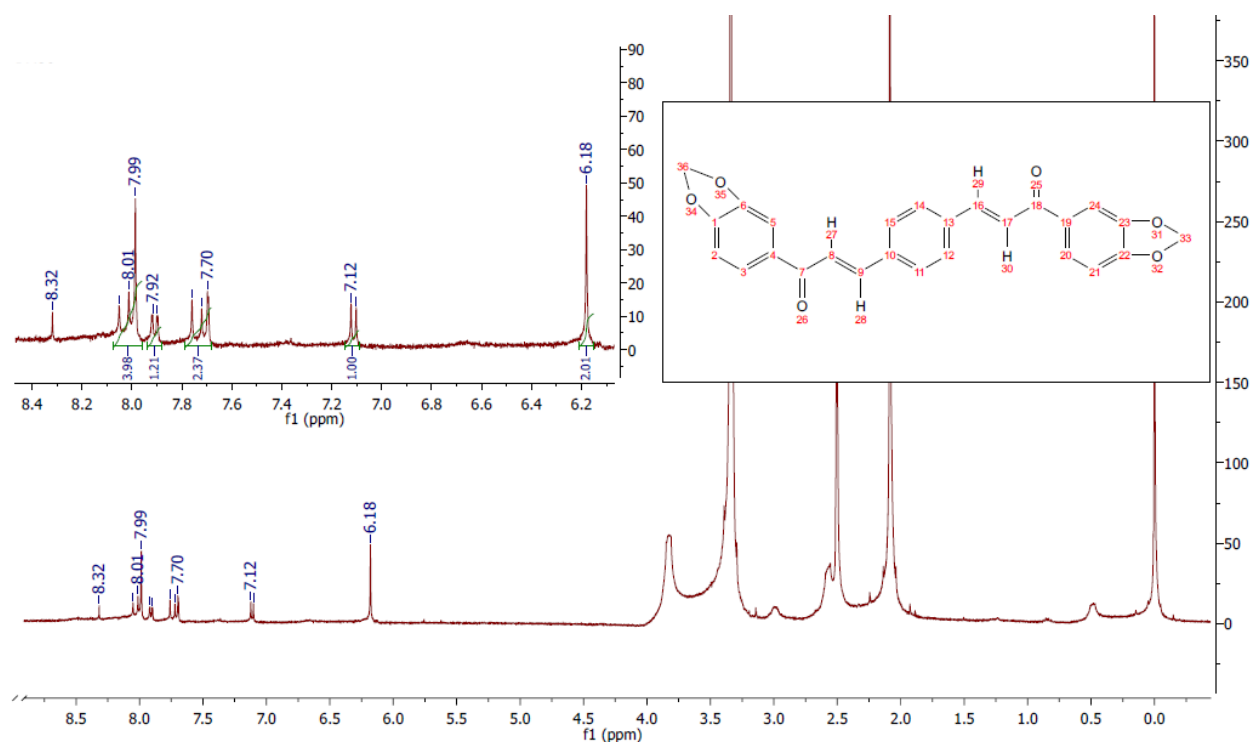


Figura 46. Espectro de RMN - <sup>1</sup>H da BC 8d. (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>). t = 6h

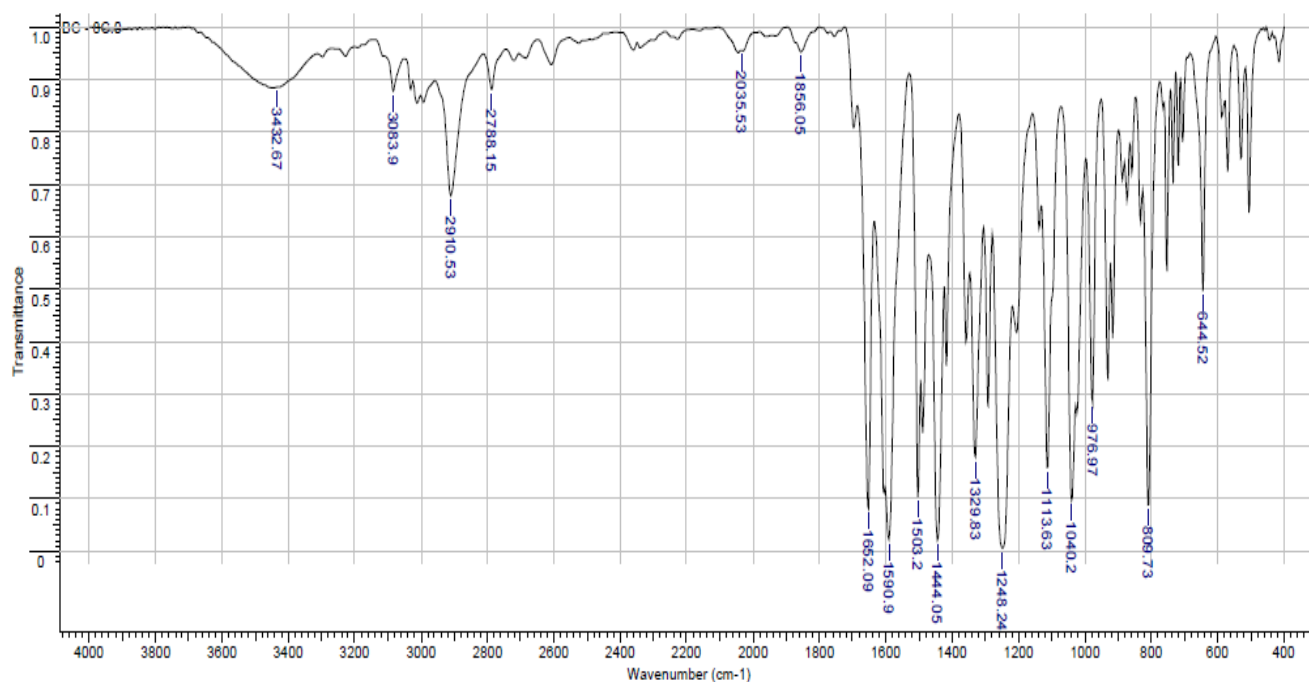


Figura 47. Espectro de IV da BC 8d (KBr). t = 6h